

Universidad Pública de Navarra

Nafarroako Unibertsitate Publikoa

**ESCUELA TECNICA SUPERIOR
DE INGENIEROS AGRONOMOS**

*NEKAZARITZAKO INGENIARIEN
GOI MAILAKO ESKOLA TEKNIKOA*

**CARACTERIZACIÓN Y AUTENTIFICACIÓN DE CARNE DE
CORDERO Y TERNERA CON TECNOLOGÍA NIRS**

presentado por

JUAN BURITICA ECHEVERRI

aurkeztua

Directoras:

Kizkitza Insausti Barrenetxea

y

Carmen Jarén Ceballos

**MÁSTER EN TECNOLOGÍA Y CALIDAD DE LAS
INDUSTRIAS AGROALIMENTARIAS**

*TEKNOLOGIA ETA KALITATEA NEKAZARITZAKO
ELIKAGAIEN INDUSTRIETAN MASTERRA*

Septiembre, 2014

INDICE DE CONTENIDOS

1.	INTRODUCCIÓN.....	6
2.	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	7
2.1	CARACTERÍSTICAS DE LA CARNE.....	7
2.1.1	DEFINICIÓN	7
2.1.2	CALIDAD DE LA CARNE.....	7
2.1.3	TEJIDO MUSCULAR Y ADIPOSO	7
2.1.4	COMPOSICIÓN QUÍMICA.....	9
2.1.4.1	PROTEÍNAS	10
2.1.4.2	LÍPIDOS	11
2.1.4.3	HIDRATOS DE CARBONO.....	13
2.1.4.4	MINERALES	14
2.1.4.5	VITAMINAS	14
2.1.4.6	FACTORES INTRÍNSECOS QUE INFLUYEN EN LA COMPOSICIÓN DE LA CARNE.....	15
2.1.4.7	FACTORES EXTRÍNSECOS QUE INFLUYEN EN LA COMPOSICIÓN DE LA CARNE.....	16
2.1.4.7.1	Alimentación	16
2.2	TECNOLOGÍA NIRS.....	17
2.2.1	DEFINICIÓN Y EVOLUCIÓN HISTÓRICA.....	17
2.2.2	PRINCIPIOS DE LA TECNOLOGÍA NIRS.....	21
2.2.3	VENTAJAS Y DESVENTAJAS DEL NIRS.....	22
2.2.4	QUIMIOMETRÍA Y ANÁLISIS MULTIVARIANTE	23
2.2.4.1	Estudios cuantitativos.....	24
2.2.4.2	Estudios cualitativos.....	27
2.2.5	APLICACIÓN DE LA TECNOLOGÍA NIRS EN CARNE Y PRODUCTOS CÁRNICOS.....	29
2.2.5.1	Composición química	31
2.2.5.1.1	Agua.....	31
2.2.5.1.2	Grasa.....	32
2.2.5.1.3	Proteínas.....	33
3.	OBJETIVOS.....	35
4.	MATERIAL Y MÉTODOS	36

4.1	MATERIAL ANIMAL	36
4.2	ESPECTROFOTÓMETRO	37
4.3	TOMA DE MEDIDAS	38
4.4	EXPERIMENTO 1 (Objetivo 1).....	38
4.4.1	Análisis.....	38
4.5	EXPERIMENTO 2 (Objetivo 2).....	38
4.5.1	Tratamiento de datos	39
4.5.1.1	Análisis de componentes principales (ACP)	39
4.5.1.2	Análisis discriminante por Mínimos Cuadrados Parciales (PLS-DA).....	43
4.6	EXPERIMENTO 3 (Objetivo 3).....	45
4.6.1	Diseño del experimento y material	45
4.6.2	Espectrofotómetro.....	48
4.6.3	Análisis estadístico.....	49
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	51
5.1	EXPERIMENTO 1	51
5.2	EXPERIMENTO 2.....	54
5.2.1	ACP.....	55
5.2.2	PLS-DA	60
5.3	EXPERIMENTO 3.....	64
5.3.1	ACP.....	69
5.3.2	PLS-DA	73
6.	CONCLUSIONES.....	78
7.	BIBLIOGRAFÍA.....	79

INDICE DE TABLAS

Tabla 2.1. Composición química de la carne.....	10
Tabla 4.1. Estudio del efecto de la alimentación en corderos.....	36
Tabla 4.2. Estudio del efecto de la alimentación en ternera.....	37
Tabla 4.3. Resumen preparación de las muestras de carne de cordero.....	47
Tabla 4.4. Resumen preparación de las muestras de carne de ternera.....	48
Tabla 5.1. Capacidad de diferenciación de grupos de alimentación en carne de cordero y de ternera.....	56
Tabla 5.2. Porcentaje de muestras de carne de cordero bien clasificadas por tipo de alimentación.....	60
Tabla 5.3. Proporciones de sensibilidad y especificidad en carne de cordero por tipo de alimentación.....	61
Tabla 5.4. Porcentaje de muestras bien clasificadas de los grupos de alimentación control y chia de carne de cordero.....	61
Tabla 5.5. Proporciones de sensibilidad y especificidad obtenidas en el PLS-DA en dos grupos de alimentación en carne de cordero.....	61
Tabla 5.6. Porcentaje de muestras de carne de ternera bien clasificadas por tipo de alimentación.....	62
Tabla 5.7. Proporciones sensibilidad y especificidad para las muestras de carne de terneros sometidos a distintas raciones alimenticias.....	62
Tabla 5.8. Porcentaje de muestras bien clasificadas de los grupos de alimentación control y lino + vitamina E de carne de ternera.....	63
Tabla 5.9. Proporciones de sensibilidad y especificidad obtenidas en el PLS-DA en dos grupos de alimentación en carne de ternera.....	63
Tabla 5.10. Capacidad de detección de adulteraciones en carne de cordero mediante NIRS, usando diferentes pretratamientos en un ACP.....	69
Tabla 5.11. Capacidad de detección de adulteraciones en carne de ternera mediante NIRS, utilizando diferentes pretratamientos en un ACP.....	72
Tabla 5.12. Porcentaje de muestras de carne de cordero bien clasificadas como control o como adulteradas.....	74
Tabla 5.13. Proporciones de sensibilidad y especificidad en carne de cordero adulterada...75	75
Tabla 5.14. Porcentaje de muestras de carne de ternera bien clasificada como control o adulteradas.....	76
Tabla 5.15. Proporciones de sensibilidad y especificidad en carne de ternera adulterada...77	77

INDICE DE FIGURAS

Figura 2.1. Estructura del músculo estriado.....	8
Figura 2.2. Espectro electromagnético.....	19
Figura 2.3. Espectros de absorción típicos de carne de ternera, cerdo, pollo y cordero.....	30
Figura 4.1. a) Analizador NIR Luminar 5030. Brimrose. b) Esquema de funcionamiento del analizador luminar 5030.....	37
Figura 4.2. Hamburguesas empleadas en el estudio de la adulteración separadas por lotes de cincuenta muestras.....	46
Figura 4.3. Zonas de medida en cada hamburguesa.....	49
Figura 4.4. Proceso de medida de los espectros de reflectancia.....	49
Figura 5.1. Espectros característicos de la carne de cordero y de la carne de ternera.....	51
Figura 5.2. Segunda derivada de los espectros característicos de la carne de cordero y ternera.....	52
Figura 5.3. Espectros de reflectancia de carne de cordero por lotes de alimentación.....	54
Figura 5.4. Espectros de reflectancia de carne de ternera por lotes de alimentación.....	55
Figura 5.5. PCA Grupos de alimentación corderos aplicando el pretratamiento MSC con 8 PC.....	57
Figura 5.6. PCA Grupos de alimentación corderos aplicando el pretratamiento MSC + DT con 8 PC.....	58
Figura 5.7. PCA Grupos de alimentación terneros aplicando el pretratamiento MSC + DT con 8 PC.....	59
Figura 5.8. Espectros de reflectancia de las muestras de cordero adulteradas con carne de cerdo.....	64
Figura 5.9. Espectros de reflectancia de las muestras de cordero adulteradas con carne de pollo.....	65
Figura 5.10. Espectros de reflectancia de muestras de cordero adulteradas con carne de toro de lidia.....	66
Figura 5.11. Espectros de reflectancia de muestras de carne de cordero adulteradas con carne de potro.....	66
Figura 5.12. Espectros de reflectancia de muestras de carne de ternera adulterada con carne de cerdo.....	67
Figura 5.13. Espectros de reflectancia de muestras de carne de ternera adulterada con carne de pollo.....	68
Figura 5.14. Espectros de reflectancia de muestras de carne de ternera adulterada con carne de toro de lidia.....	68

Figura 5.15. Espectros de reflectancia de muestras de carne de ternera adulterada con carne de potro.....	69
Figura 5.16. ACP de las muestras de carne de cordero adulteradas con pollo, 3PC y pretratamiento 1D.....	70
Figura 5.17. ACP de las muestras de carne de cordero adulteradas con toro de lidia, 8PC y pretratamiento MSC.....	71
Figura 5.18. ACP de las muestras de carne de cordero adulteradas con toro de lidia, 8PC y pretratamiento DT.....	71
Figura 5.19. . ACP de las muestras de carne de ternera adulteradas con toro de lidia, 8PC y pretratamiento DT.....	72

1. INTRODUCCIÓN

La carne es uno de los productos más valiosos en la dieta humana, siendo muy apreciado por el consumidor, debido principalmente a su alto valor nutritivo. Continuamente se desarrollan nuevas técnicas para mejorar la calidad en alimentos, como por ejemplo, nuevos procesos de refrigeración (Wang & Sun, 2002). Con la mejora del nivel de vida, las personas actualmente prestan más atención a la seguridad y la autenticidad de la carne. Por otra parte, con el acceso a la información, los consumidores ahora están más preocupados por la carne que comen y su etiquetado. Por lo tanto, es importante un etiquetado correcto y preciso para ayudar a los consumidores a elegir los tipos adecuados de carne y de este modo satisfacer sus necesidades.

El concepto de Control de Calidad en la Industria Agroalimentaria lleva asociado múltiples definiciones que van evolucionando y modificándose a lo largo del tiempo, dependiendo de factores culturales, sociales y geográficos, entre otros. Por lo tanto, la calidad es un concepto dinámico, difícil de definir de forma precisa, aunque genéricamente se puede afirmar que es el grado de excelencia de un alimento, incluyendo todas sus características significativas que lo hacen aceptable.

La determinación de la autenticidad en carne y la detección de la adulteración han incrementado su atención dentro de la industria cárnica. Aunque cada vez se está haciendo más hincapié en el concepto de autenticidad de los alimentos, en la actualidad no es fácil identificar la prevalencia de fraude en la carne o el etiquetado incorrecto (Ballin & Lametsch, 2008).

La necesidad de alcanzar altos niveles de calidad y seguridad durante la producción de alimentos, requiere controles estrictos tanto durante todo el proceso de producción como en el de comercialización. Para llevar a cabo estos controles se requieren técnicas de análisis de alimentos entre cuyas características deseables se encuentran la rapidez, la facilidad de uso, la no preparación o mínima preparación de muestras, la no destrucción de las mismas y el bajo coste (Karoui, *et al.*, 2010).

En este sentido, en el presente trabajo de fin de máster se va a establecer un método para el análisis de muestras de carne de cordero y ternera mediante espectroscopía NIR y se va a comprobar la capacidad de la tecnología NIRS para clasificar la carne entre especies y por tipo de alimentación dentro de cada especie.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 CARACTERÍSTICAS DE LA CARNE

2.1.1 DEFINICIÓN

Según la Real Academia de la Lengua Española (RAE) el término “carne” se define como “la parte muscular del cuerpo de los animales”. Desde el punto de vista bromatológico, la carne se define como el producto alimenticio resultante de la transformación experimentada por el tejido muscular del animal a través de una serie concatenada de procesos fisicoquímicos y bioquímicos, que se desarrollan como consecuencia del sacrificio del animal. Desde el punto de vista legal, la carne es el conjunto de músculos esqueléticos de los animales de abasto que se utilizan como alimento, junto con el correspondiente tejido conectivo, vasos, nervios y tejido graso.

2.1.2 CALIDAD DE LA CARNE

En cuanto al término “calidad” cabe destacar que este es un concepto complejo y difícil de definir, ya que puede tener distintas interpretaciones en función del eslabón de la cadena de comercialización en que un producto se encuentre (producción, procesado, punto de distribución o consumo). Sin embargo, una de las definiciones más extendidas desde el punto de vista del consumidor ha sido la propuesta por Hammond en 1995: “Aquello que gusta al consumidor y por lo que está dispuesto a pagar más que el precio medio”. No obstante, desde el punto de vista de la carne, esta definición puede tener varias interpretaciones para el consumidor, el cuál puede atender a diferentes criterios como son el valor nutritivo o las cualidades higiénico-sanitarias, tecnológicas y sensoriales u organolépticas del producto a consumir. En definitiva, la calidad de la carne va a depender de diversos factores en función del criterio establecido (Andersen *et al.*, 2005; Brunsø *et al.*, 2005).

2.1.3 TEJIDO MUSCULAR Y ADIPOSEO

El tejido muscular es un tejido diferenciado y especializado, cuyo destino es convertir la energía química en movimiento mecánico y trabajo. Además, presenta metabolismos energéticos que influyen en su composición química, así como en algunas de sus características organolépticas, particularmente en el color y la textura.

La inspección visual de un músculo disecado muestra que está rodeado por una lámina de tejido conectivo llamada epimisio. De su superficie interna parten ramas de tejido al interior del músculo separado en haces de fibras musculares. Estos tabiques de separación portan vasos

sanguíneos y nervios y constituyen el conjunto del perimysio. A partir del perimysio se forma una fina red de tejido conectivo que rodea a cada fibra muscular (endomysio). El tamaño de los haces de fibras musculares influye sobre la textura de la carne resultante (Hawthorn, 1983). Hacia los extremos del músculo, el epimysio, perimysio y endomysio se unen para constituir agregados, formándose los tendones que unen el músculo al hueso.

La unidad estructural esencial de todos los músculos es la fibra muscular. Las fibras musculares son células multinucleadas, estrechas y largas, que pueden extenderse de uno a otro extremo del músculo y alcanzar unos 30 cm de longitud, con diámetros de 10 μm a 100 μm (Walls, 1960). Rodeando a cada fibra y debajo del tejido conectivo del endomysio existe otra lámina denominada sarcolema. Dentro de esta vaina se encuentran las miofibrillas que están bañadas por una fase fluida denominada sarcoplasma. Este también contiene ciertas estructuras formes, tales como las mitocondrias o sarcosomas, los cuerpos lipídicos sarcoplásmicos y el retículo endoplasmático (Bennett, 1960). Las miofibrillas están formadas por numerosos filamentos paralelos, filamentos gruesos, formados principalmente por la proteína miosina, y filamentos delgados, formados en su mayor parte por una segunda proteína llamada actina. Juntos constituyen el mecanismo contráctil del musculo (figura 2.1).

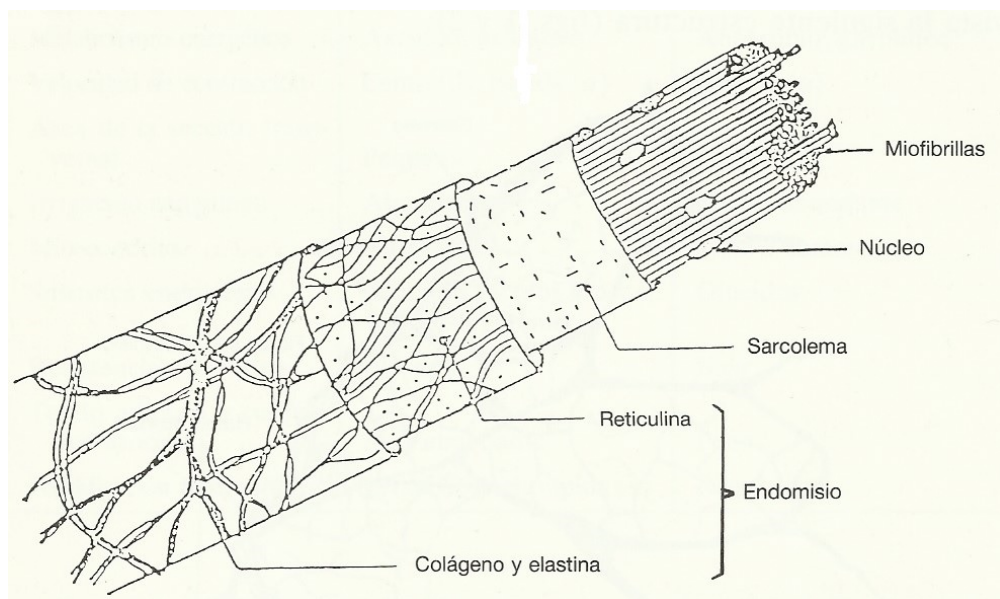


Figura 2.1. Estructura del músculo estriado (Price *et al.*, 1976)

El tejido adiposo se forma por depósito de grasa dentro de las células de tejido conectivo. Cualquier tejido conectivo puede volverse adiposo, pero la tendencia mayor se muestra en los músculos que sostienen las vísceras abdominales. Los principales depósitos grasos del organismo se clasifican del siguiente modo (Hawthorn, 1983):

- Subcutáneo: el tejido adiposo se haya inmediatamente debajo de la piel.
- Perirrenal: tejido adiposo que rodea al riñón.
- Intramuscular: depósito graso a lo largo del perimio dentro del músculo.
- Intermuscular: los tejidos entre músculos.

La composición global de cualquier porción de carne de una canal variará de acuerdo con el engrasamiento del tejido conectivo, el cuál a su vez refleja el estado nutritivo del animal antes del sacrificio.

Aunque el tejido conjuntivo es el vehículo que soporta las células adiposas, no tiene por qué estar necesariamente infiltrado con grasa. Si se elimina la grasa, su principal constituyente es la proteína fibrosa colágeno. El colágeno es correoso, insoluble e inelástico y al hervirlo se convierte fácilmente en gelatina soluble en agua. Otros constituyentes del tejido conectivo son la elastina y la reticulina. La elastina es prácticamente insoluble y no se ablanda al cocinar. La reticulina es un componente del tejido conectivo comparativamente menos importante y parece que no juega un papel importante en la calidad de la carne (Hawthorn, 1983).

2.1.4 COMPOSICIÓN QUÍMICA

En términos generales puede decirse que la carne contiene aproximadamente un 75% de agua, un 18% de proteína, un 3,5% de sustancias no proteicas solubles y un 3% de grasa (Lawrie, 1977). Estos datos, sin embargo, no dicen nada acerca de las variaciones en la naturaleza y las propiedades de la carne. Es preciso tener en cuenta que la carne es el reflejo post-mortem de un complicado sistema biológico constituido fundamentalmente por tejido muscular y que este último se halla diferenciado de acuerdo con la función que desempeña en el organismo. Para la determinación de estos valores generalmente se utiliza el músculo longissimus thoracis, ya que este es un buen indicador de la composición química de los principales músculos de la canal (Sañudo *et al.*, 2001). En la tabla 2.1 se puede ver la composición química aproximada de algunas especies.

Tabla 2.1. Composición química de la carne

	% Humedad	% Proteínas	% Grasa	% Cenizas
Ternera	74,6	22	2,2	1,2
Cordero *	75	21	2,05	1,1
Potro **	71,17	23,61	5,21	1,1
Toro ***	72,74	22,21	4,14	7,1
Cerdo	75,3	21,1	2,4	1,2
Pollo	74,4	23,3	1,2	1,1

Fuente: Hernández, 2010; * Beriain *et al.*, 1993; ** Ruiz, 2013; *** Eurocarne, 2012

2.1.4.1 PROTEÍNAS

La mayor parte de las sustancias nitrogenadas de la carne está constituida por proteínas, que son casi siempre el componente más abundante de la carne, superado únicamente por el agua. Del contenido total de nitrógeno del músculo, aproximadamente el 95% es proteína y el 5%, pequeños péptidos, aminoácidos y otros compuestos (Hernández, 2010). Las proteínas de la carne son, en esencia, muy similares en todos los animales de abasto y tanto el contenido como el tipo de aminoácidos es prácticamente el mismo en las diferentes especies. Las proteínas se pueden clasificar, atendiendo a su solubilidad, en tres grandes grupos:

2.1.4.1.1 Proteínas sarcoplásmicas

Son solubles en agua o en tampones de poca fuerza iónica. A este grupo pertenecen dos tipos principales de proteínas: el primero, compuesto por enzimas, y el segundo, por sustancias que participan en el color de la carne, como la mioglobina y pequeñas cantidades de hemoglobina, dado que ésta se elimina en su mayoría durante el sangrado del animal en el sacrificio.

2.1.4.1.2 Proteínas miofibrilares

Para su extracción, necesitan el uso de tampones de fuerza iónica media o alta. Son las más abundantes, constituyendo el 65-75% del total de las proteínas musculares. En este grupo se incluye un gran número de proteínas asociadas a los filamentos gruesos y delgados del tejido muscular, destacando la actina, miosina, actomiosina, tropomiosina, troponina, actininas y proteínas C y M. Todas estas proteínas tienen, de una u otra forma, una gran importancia en los cambios bioquímicos que suceden tras el sacrificio del animal.

2.1.4.1.3 Proteínas insolubles del estroma

Constituyen las fibras extracelulares del colágeno, elastina y reticulina que, a su vez, forman parte del tejido conectivo típico que recubre las fibras y haces musculares. El principal valor nutritivo de la carne consiste en que es una excelente fuente de proteínas, en cantidad y calidad. La proteína cárnica es de alta calidad por su rápida desintegración por los jugos gástricos, lo que determina su digestibilidad (94-98% frente al 78-88% en las proteínas vegetales) (Hernández, 2010). No obstante, en la digestibilidad influye de manera negativa la cantidad de tejido conectivo que posea la pieza cárnica, especialmente de colágeno y elastina. Así, las piezas de categoría comercial segunda o tercera poseen una mayor proporción de tejido conectivo, que además aumenta con la edad del animal.

Por otra parte, el valor biológico de las proteínas de la carne viene determinado por la presencia y el equilibrio de aminoácidos esenciales que ésta posea para la especie humana, que, en el caso de piezas con poca proporción en colágeno y elastina, es muy elevada, ya que contiene todos los aminoácidos esenciales en proporciones bastante adecuadas a las requeridas para el buen desarrollo de los tejidos humanos. Cabe destacar el aporte de lisina y treonina. Sin embargo, en el colágeno falta el triptófano, escasea la metionina, abunda la valina y sobresale el contenido en hidroxiprolina, glicina y prolina.

Cuando se comparan los contenidos en aminoácidos esenciales de las proteínas cárnicas de diversas especies animales, pueden observarse algunas diferencias que, en ocasiones, se deben a la influencia de factores como la edad o la alimentación.

2.1.4.2 LÍPIDOS

Los lípidos resultan imprescindibles para la aceptabilidad de la carne, ya que su concentración en la misma y la composición de cada una de las fracciones lipídicas influyen de manera importante en sus propiedades organolépticas (textura, jugosidad, sabor, aroma, color, etc., de los alimentos cocinados). Tampoco hay que olvidar que las grasas aportan ácidos grasos esenciales y que son a su vez vehículo de vitaminas liposolubles, especialmente de la vitamina A. No obstante, muchas investigaciones han señalado que la grasa de la carne produce efectos negativos en la salud de los consumidores, aunque recientemente se ha sugerido que estas afirmaciones son una simplificación excesiva (Hernández, 2010). No todas las grasas animales son metabólicamente equivalentes y algunos lípidos de origen animal son potencialmente beneficiosos para la salud.

El contenido lipídico del principal componente de la carne, el músculo, es muy variable, aproximadamente del 1,5 al 13%. Consta fundamentalmente de lípidos de depósito y

estructurales. Los lípidos de depósito son la fuente de energía celular. Están constituidos por ésteres de glicerol con ácidos grasos, predominando los triglicéridos, aunque también pueden contener pequeñas cantidades de monoglicéridos, diglicéridos y ácidos grasos libres. Aunque algunos lípidos neutros están presentes como acúmulos microscópicos en el interior de las células musculares, la mayoría se localizan en los adipocitos del tejido conectivo laxo que se encuentra entre los haces musculares, principalmente en el perimisio. La fracción lipídica es, generalmente, el componente más variable de la carne ya que su contenido depende de diversos factores, entre los que cabe destacar la raza (Cerdeño *et al.*, 2001; Scollan *et al.*, 2005), el sexo (Varela *et al.*, 2003), la edad (Renand *et al.*, 2001) y el tipo de alimentación (O'Sullivan *et al.*, 2003). Las características de la grasa de la carne son de gran interés desde el punto de vista nutritivo, tecnológico y gastronómico.

Además de los lípidos de depósito, en las membranas celulares existen lípidos estructurales, entre los que se encuentran los fosfolípidos y el colesterol, esenciales para la función celular. En contraste con los lípidos de reserva, los de las membranas celulares presentan una composición similar en todas las especies animales, a pesar de las amplias diferencias en la dieta y las condiciones medioambientales. Los animales, además de la grasa muscular, contienen grasa de depósito localizada principalmente como capa subcutánea aunque, así mismo, puede estar presente entre los músculos como depósito intermuscular y en la cavidad corporal, alrededor de los riñones, región pélvica y corazón.

Los ácidos grasos que se encuentran formando parte de las grasas animales difieren en la longitud de la cadena hidrocarbonada y en el número y tipo de enlaces que unen los átomos de carbono. La gran mayoría de los ácidos grasos de los lípidos animales tienen un número par de átomos de carbono de longitud comprendida entre 12 y 22 átomos. Los principales ácidos grasos saturados de la carne son, de mayor a menor concentración, palmítico (16:0), esteárico (18:0) y mirístico (14:0). El ácido oleico (18:1 n-9) es el monoinsaturado más abundante, seguido del palmitoleico (16:1 n-7). Los ácidos linoleico (18:2 n-6), α -linolénico (18:3 n-3) y araquidónico (20:4 n-6) son los principales ácidos grasos poliinsaturados. Los ácidos grasos saturados y monoinsaturados son los mayoritarios en los triglicéridos de la grasa de la carne. No obstante, la concentración de los ácidos grasos de los lípidos de depósito puede variar dependiendo de la especie animal, raza, sexo, edad, condiciones ambientales y de alimentación. Los ácidos grasos de los tejidos de los rumiantes son más saturados, debido a que los microorganismos del rumen hidrogenan los ácidos grasos insaturados de la dieta.

Los lípidos polares tienen un mayor contenido en ácidos grasos poliinsaturados, aunque la proporción de los diferentes ácidos grasos en los fosfolípidos presenta menos diferencias entre especies que las que se observan en los lípidos de almacenamiento. La extensión de la modificación de los ácidos grasos de los fosfolípidos depende de la concentración de los ácidos

grasos suministrados en la alimentación, aunque en menor extensión que en el caso de los triglicéridos.

El mayor desafío actual es la reducción de los ácidos grasos saturados en la carne, principalmente del ácido palmítico, y el incremento de la cantidad de ácidos grasos monoinsaturados. La reducción de los ácidos grasos saturados se aconseja porque la presencia de colesterol y ácidos grasos conjuntamente en las dietas eleva la concentración de lipoproteínas de baja densidad en el suero, lo que está asociado a la presencia de enfermedades coronarias. Si los ácidos grasos poliinsaturados reemplazan a los saturados, se reducen las lipoproteínas de baja densidad y también las de alta densidad. Sin embargo, los ácidos grasos monoinsaturados reducen los niveles de las lipoproteínas de baja densidad sin reducir los niveles de las de alta densidad (Hernández, 2010).

Desde el punto de vista gastronómico, se ha descrito una relación positiva entre la cantidad de grasa intramuscular infiltrada en el músculo y las características sensoriales que el consumidor percibe, como son la terniza, la jugosidad y el flavor (Capillo y de Arcos, 2001).

2.1.4.3 HIDRATOS DE CARBONO

En la carne, los hidratos de carbono están principalmente representados por el glucógeno, polisacárido formado por moléculas de glucosa que tiene una gran influencia en los cambios musculares tras el sacrificio. Tras la muerte, el glucógeno muscular es degradado rápidamente, dando como producto final ácido láctico fundamentalmente. El contenido de glucógeno no tiene ningún significado desde el punto de vista nutritivo; sin embargo, es esencial para la acidificación post-mortem de la carne (pH final) y tiene un papel importante sobre su sabor, textura e incluso conservación.

Los carbohidratos representan un bajo porcentaje del total de los componentes de la carne, principalmente debido a la escasa presencia del carbohidrato muscular mayoritario, el glucógeno. Este hecho se debe a que, tras el sacrificio del animal, se produce un fallo respiratorio y circulatorio que se traduce en un cese del aporte de nutrientes y de oxígeno a las células. Consecuentemente, éstas consumen sus reservas de energía en forma de glucógeno hasta que aparece el rigor mortis (Monin, 1988; Beriaín y Lizaso, 1998).

La carne de caballo se caracteriza por su elevado contenido en glucógeno (Franco *et al.* 2011) que le confiere un sabor más suave y dulce que el de la carne de vacuno (Rossier y Berger, 1988).

2.1.4.4 MINERALES

La carne contiene todas las sustancias minerales que son necesarias para el organismo humano. Aunque las especies animales no ofrecen entre ellas diferencias muy significativas, cabe destacar, entre las carnes, la de ternera y las de caza por su mayor contenido en fósforo. No obstante, su importancia nutricional radica en la cantidad de micronutrientes minerales esenciales que proporciona, es decir, los denominados elementos traza u oligoelementos. Los niveles de hierro son especialmente destacables: ningún otro alimento de la dieta posee una biodisponibilidad de este elemento tan elevada como las carnes rojas, ya que se encuentra en forma de hierro hemo (en la hemoglobina y mioglobina del músculo), que se absorbe de forma más eficiente que el hierro no hemo presente, por ejemplo, en los alimentos de origen vegetal. Cabe destacar el elevado contenido de hierro hemo en la carne de caballo.

Por otra parte, alrededor del 70% del zinc consumido por la población en países desarrollados lo proporcionan los productos de origen animal, especialmente la carne. Además, se ha demostrado que, al igual que ocurre con el hierro, el zinc procedente de alimentos de origen animal está más disponible para el organismo humano que el que procede de los vegetales. Aunque el selenio no se presenta en una cantidad excesivamente destacada en la carne y los productos derivados, la forma química ligada a las proteínas la hace altamente eficaz desde el punto de vista de su utilización por el organismo.

2.1.4.5 VITAMINAS

La carne es también una fuente importante de vitaminas hidrosolubles, principalmente del complejo B (tiamina, riboflavina, niacina, ácido pantoténico y ácido fólico). Casi el 69% del aporte de vitamina B12 de la dieta humana procede de la carne, y en algunas dietas occidentales, el 96% de la B6 (Hernández, 2010). Sin embargo, la vitamina C es muy escasa en este alimento. Los contenidos en vitaminas del grupo B presentan diferencias entre las especies animales. Así, la carne de cerdo posee 10 veces más tiamina que la carne de vacuno y cordero. Dentro de una misma especie también existen diferencias, ya que la carne de ternera supera en contenido a la carne de vaca en cantidad de riboflavina y niacina.

Las vitaminas liposolubles se encuentran en la grasa de la carne y, especialmente, en las vísceras. El hígado es la principal fuente dietética de vitamina A. Otras vitaminas liposolubles se encuentran en menor cuantía, contribuyendo, por ejemplo en el caso de la vitamina E, al 7-8% de la ingesta de esta vitamina antioxidante, y aun menor en el caso de la vitamina D.

2.1.4.6 FACTORES INTRÍNSECOS QUE INFLUYEN EN LA COMPOSICIÓN DE LA CARNE

Los factores intrínsecos que influyen, no sólo en la composición química, sino en el resto de los parámetros que determinan la calidad de la carne, son factores que dependen única y exclusivamente del animal del que procede la carne. De entre ellos cabe destacar la raza, edad y sexo del animal.

De unas razas a otras pueden existir diferencias en el porcentaje en proteínas, diámetro de las fibras musculares y comportamiento frente a la fuerza de la cizalla de la carne, pero las variaciones más amplias se observan en el contenido en grasa, que siempre es mayor en los animales que han sido sometidos a una menor selección genética. Así, la precocidad de los animales de aptitud lechera favorece el depósito de grasa intramuscular, por lo que sacrificados a la misma edad presentarán una carne más jugosa que las razas cárnicas (Beriaín y Lizaso, 1998).

La edad afecta a la composición de la canal, en especial a la relación músculo/hueso/grasa y a la riqueza de la grasa intramuscular. Cuantitativamente, la grasa intramuscular es el constituyente químico más variable en el músculo de manera que la proporción de este componente se incrementa conforme aumenta la edad o peso del animal, ya que es un depósito de desarrollo tardío (Aberle *et al.*, 2001). La intensidad del color de la porción magra aumenta con la edad debido a que influye de forma directamente proporcional en el contenido en mioglobina. La edad influye a su vez en la composición de la carne tanto en lo referente a la grasa, ya que se acumula más grasa a medida que envejece; como en las proteínas que, al avanzar la edad, contienen menos colágeno aunque con más entrecruzamientos.

El sexo afecta al contenido en grasa intramuscular: los machos poseen menos que las hembras. Además, la castración afecta tanto a la riqueza de la grasa, que es mayor en los animales castrados, como a su composición, que se refleja fundamentalmente en los ácidos grasos, siendo más insaturados en los animales enteros. En cuanto al contenido de proteína en el músculo, las diferencias entre sexos no están tan claras. De esta forma, Varela *et al.*, (2001) no observaron diferencias significativas entre machos y hembras, en carne de terneros de raza Rubia Gallega sacrificados sin destetar antes de los 10 meses de edad. No obstante, Destefanis *et al.*, (2003) reflejaron, en carne de ganado bovino perteneciente a la raza Piemontesa, un mayor contenido de proteína en los machos castrados que en los enteros.

2.1.4.7 FACTORES EXTRÍNSECOS QUE INFLUYEN EN LA COMPOSICIÓN DE LA CARNE

Los factores extrínsecos que afectan a la composición de la carne son igualmente diversos, pero sin lugar a dudas el de mayor importancia es la alimentación. Por ejemplo, si se aumenta el contenido en carbohidratos o grasa en la dieta se favorece el engrasamiento de las canales, mientras que no tiene efecto en la composición protéica. Este factor se ve influenciado también por el tipo de especie, puesto que los animales monogástricos tienden a depositar la grasa de la dieta sin apenas modificaciones. Sin embargo, en los rumiantes la composición de la grasa es más constante, dado que los microorganismos del rumen pueden hidrogenar los dobles enlaces de los ácidos grasos, lo que se manifiesta en un menor efecto de la dieta en la composición de los ácidos grasos. En general, aquellos animales que han consumido dietas ricas en piensos concentrados presentan una mayor proporción de grasa que los que se han alimentado con forrajes (O'Sullivan *et al.*, 2003).

El tiempo y las condiciones de transporte, como principales factores causantes de estrés en los animales, parecen ejercer también un efecto sobre la composición química de la carne. El estrés que sufren los animales previamente al sacrificio provoca un consumo excesivo de glucógeno muscular antes del mismo, por lo que la presencia de este carbohidrato en carne tanto en el momento del sacrificio como posteriormente, es minoritaria (Briskey *et al.*, 1959; Chrystall, 1982; Beriaín y Lizaso, 1998).

2.1.4.7.1 Alimentación

La alimentación característica de cordero y ternera se basa en leche materna hasta el destete y posteriormente en dietas herbales (pastos y forrajes) y/o piensos concentrados a base de cereales para su engorde hasta el sacrificio. La alimentación con dietas enriquecidas en grasas y aceites puede modificar el perfil de ácidos grasos de la carne. Por ejemplo, el empleo de aceites de pescado, algas marinas y de semilla de lino aumenta el nivel de ácidos grasos poliinsaturados, aldehídos y otros compuestos secundarios, como por ejemplo, 3-tiazolinas y tiazoles generados por reacción de compuestos carbonilo y sulfurados tras el cocinado (Elmore *et al.*, 2005). Aunque la alimentación está cada vez más controlada, pueden producirse sabores anómalos por alimentación con determinados residuos de la industria alimentaria, subproductos vegetales, vegetales inapropiados o dosis excesivamente altas de estos. Además, la suplementación dietética con antioxidantes, como la vitamina E, reduce el enranciamiento de la carne fresca y cocinada, aunque no proporcionan sabores propios a la carne. El mismo efecto tiene incorporar determinados compuestos antioxidantes activos a través de la dieta, suplementando a los ovinos con vegetales ricos en antioxidantes naturales.

Estudios recientes muestran que la alimentación de corderos con chia, una planta oleaginosa que constituía uno de los pilares de la alimentación de las civilizaciones precolombinas del continente americano, posee un alto contenido en ácidos grasos poliinsaturados (Ayerza y Coates, 2006). Tiene un efecto positivo en la mejora del perfil de ácidos grasos. Los resultados obtenidos en dichas experiencias muestran que, por efecto de la ingestión de chia, el perfil de ácidos grasos de la carne varía significativamente, mejorando la relación n-6/n-3 hasta valores de 3:1 sin que las características organolépticas y sensoriales de la carne se vean afectadas (Mendizabal *et al.*, 2011).

2.2 TECNOLOGÍA NIRS

2.2.1 DEFINICIÓN Y EVOLUCIÓN HISTÓRICA

Se entiende por espectroscopía el estudio de fenómenos de absorción, emisión y dispersión de la radiación electromagnética producidos por la interacción de ésta con la materia (átomos neutros, iones o moléculas). La radiación electromagnética se distingue en función de su longitud de onda característica. A grandes rasgos, la espectroscopía requiere una radiación procedente de una fuente, un selector de longitud de onda y un detector. Su desarrollo se haya íntimamente relacionado con el de la óptica y otras ramas de la física (Ventura, 2006).

El primer antecedente clásico que se puede asociar con el concepto de espectroscopía (del latín *spectrum*, imagen, y del griego *σκοπέω*, mirar) se corresponde con la serie de experimentos llevados a cabo por Isaac Newton (1643-1727) a partir de 1665 (Hollas, 2004). En estos famosos ensayos, Newton estudió la descomposición de la luz blanca en bandas de diferentes colores, conseguida con la ayuda de un prisma triangular.

En 1800, el astrónomo inglés Sir William Herschel (1738-1822) desarrolló un experimento con el objetivo de determinar qué color dentro del espectro visible era responsable del calor del sol. Tomando un termómetro y un prisma para separar los colores que componen la luz blanca solar, fue comprobando qué ocurría cuando colocaba el termómetro debajo de cada uno de los colores, sin detectar ninguna variación hasta llegar al rojo. En este caso, la temperatura empezó a subir. De este modo, verificó que había presencia de energía a pesar de no ser visible y la denominó “Infrarrojo”, utilizando el prefijo latino que significa “por debajo de” (Bergera *et al.*, 2006; Davies, 1998: Norris referencia).

A pesar de que el descubrimiento generó gran curiosidad, lo cierto es que era más fácil trabajar el espectro visible, en el que las bandas de luz podían ser captadas visualmente, que el infrarrojo. Además, la invención del plato fotográfico facilitó el estudio del espectro visible y

dio pie al estudio del ultravioleta (UV), quitándole protagonismo e interés al hallazgo de Sir William Herschel.

Un siglo después, el físico americano W. W. Coblentz (1873-1962) construyó un espectrómetro con un prisma de sal de roca. El detector era una termopila que se conectaba a un galvanómetro de espejo. Coblentz entraba a la sala donde tenía el espectrómetro, giraba el prisma un pequeño ángulo y volvía a salir de la estancia. Esperaba entonces a que la sensibilidad del aparato se estabilizara para poder leer la desviación del galvanómetro con un telescopio. Para cada posición del prisma realizaba dos medidas: primero con muestra y luego sin ella; e invertía todo el día en dibujar un espectro completo, punto por punto.

Coblentz midió el espectro de cientos de compuestos en el infrarrojo medio, entre 1 y 15 micrómetros (μm) y comprobó que no había dos elementos iguales. El espectro infrarrojo es una “huella dactilar” que identifica cada compuesto. Así, por ejemplo, el etanol y el metil éter están formados por el mismo número de átomos de carbono, hidrógeno y oxígeno, pero tienen espectros infrarrojos diferentes.

Por otra parte, Coblentz se percató de que en el espectro de componentes químicos similares se repetían ciertos “patrones”, con bandas de absorción semejantes. Los alcoholes, por ejemplo, tienen bandas de absorción de cerca de $2,7 \mu\text{m}$; así como los fenoles, ácidos carboxílicos y el resto de compuestos con grupos $-\text{OH}$. Esta indicación permitió a los químicos obtener más información sobre la estructura de aquellos compuestos cuyos espectros fueran medibles; aunque, precisamente, el principal obstáculo durante décadas para avanzar en estos estudios fue que sólo unos pocos químicos podían medir los espectros infrarrojos.

Coblentz construyó un equipo capaz de calcular el espectro con suficiente calidad en unos 15 minutos. Tras la II Guerra Mundial se creó a su vez el primer equipo de infrarrojos comercial, basado en los equipos utilizados en el programa de caucho sintético desarrollado por EE.UU. Con los equipos actuales, tan sólo se tarda unos segundos en calibrar el espectro.

Gracias a la labor de Herschel y Coblentz, los científicos se percataron de la relevancia del llamado “Espectro Electromagnético” –la representación gráfica de la interacción de la radiación electromagnética, que abarca la energía contenida en fotones (unidades portadoras de radiación) desde longitudes de onda de varios metros de longitud hasta inferiores a los 10^{-2} nm –. Este espectro electromagnético se divide en distintas regiones, llamadas “regiones espectrales”, entre las que se encuentra definido el infrarrojo cercano (NIR), tal y como se aprecia en la figura 2.2.

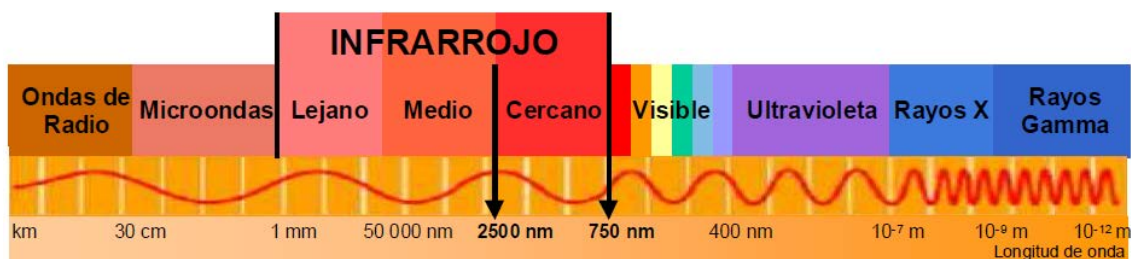


Figura 2.2. Espectro electromagnético. Fuente: Prieto 2006.

La región NIR fue investigada por unos pocos espectroscopistas, ya que la mayoría prefirió evitar este análisis debido a las características del espectro: bandas anchas, solapadas y de baja intensidad, que dificultaban la asignación visual de bandas a estructuras o grupos funcionales. En el infrarrojo medio, no hay picos pronunciados, es común la pérdida de resolución de la línea base, existen abundantes solapas en los picos y se pierde sensibilidad.

Entre los años 1931 y 1985 tan sólo se realizaron 923 referencias a la región NIR. Kubelka y Munk fueron los primeros. Trabajaron la reflectancia difusa y abrieron la puerta a esta técnica de muestreo simple. Sin embargo, la mayoría de los estudios ignoraron su publicación y trabajaron en transmitancia. En 1948, Kubelka publicó de nuevo su conocida ecuación Kubelka-Munk (K-M), esta vez en el campo de las matemáticas.

En la década de los años 50, Wibur Kaye divulgó dos artículos de revisión: uno sobre NIR y otro sobre el uso del hardware. Estas primeras aplicaciones analíticas fueron posibles gracias a la aparición de los primeros espectrofotómetros comerciales, equipados con detectores fotoeléctricos (McClure, 2001). En 1954, Kaye presentó un estudio en el que se registraban espectros de distintos líquidos orgánicos en la región comprendida entre 700 y 350 nm, asignando las bandas a los diferentes grupos funcionales de la molécula. Además, mostraba posibles aplicaciones analíticas de la técnica, como la determinación de agua y alcoholes y el análisis de aminas e hidrocarburos.

En 1960, el químico industrial Robert Goddu revisó los trabajos sobre análisis cuantitativo de grupos funcionales orgánicos. Hasta ese momento, la técnica de análisis NIR se había utilizado únicamente en unos 40 trabajos. Muchos investigadores se basaron en lo realizado por sus predecesores, identificando una longitud de onda en la que podrían ser cuantificados analitos individuales.

Pero, sin duda, el gran impulso en la aplicación de la técnica NIR lo dio Karl Norris en la década de los 60. Líder de un grupo de investigación de la United States Department of Agriculture (USDA), Norris comenzó estudiando las matrices complejas de origen natural. El concepto de utilización de múltiples longitudes de onda y análisis de regresión multivariable ya había surgido, pero no se dio a conocer hasta que en 1968 Ben-Gera y

Norris publicaron su primer estudio aplicando el análisis NIR para productos agrarios, incluyendo medidas de grasa y contenido de agua en carne, humedad en soja y grasa y contenido de agua en leche. Sus trabajos, orientados al campo del análisis agroalimentario, lograron aumentar notablemente el interés por la espectroscopía NIR.

A finales de los años 70 se empezaron a desarrollar nuevos equipos con diseños mejorados y mayores prestaciones, en lugar de los instrumentos comerciales de filtros, que se habían diseñado hasta ese momento para aplicaciones específicas. Se construyeron los primeros espectrofotómetros que permiten registrar espectros de forma más rápida y reproducible. El desarrollo de la informática también ayudó a una mayor expansión de la técnica y puso al alcance del usuario una capacidad de cálculo inexistente hasta entonces, permitiendo que pudieran usar algoritmos relativamente complejos para salvar uno de los principales problemas que plantea la técnica: la no especificidad de las bandas de absorción.

En los últimos años, de la mano de los nuevos avances tecnológicos, el número de aplicaciones NIR en distintos ámbitos ha aumentado ampliamente. En este momento se pueden encontrar aplicaciones de la técnica, por ejemplo, en el análisis de alimentos, productos farmacéuticos, fibras textiles de polímeros y derivados del petróleo.

El notable interés que ha despertado la espectroscopía NIR en el sector industrial ha surgido como consecuencia directa de dos de las ventajas que ofrece como herramienta analítica para el control de calidad. Por un lado, la baja absorptividad molar de las bandas de absorción permite trabajar en modo de reflectancia, con la virtud de poder registrar el espectro de muestras sólidas sin necesidad de hacer ningún otro tratamiento, aumentando de esa forma el número y la frecuencia de los análisis. Por otra parte, la doble dependencia de la señal con la naturaleza química y física de la muestra permite su identificación y la determinación de parámetros químicos y físicos de la misma.

En la actualidad, la espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano ha demostrado ser una técnica analítica de una gran versatilidad, rapidez, eficacia y con un bajo coste de mantenimiento (Prevolnik *et al.*, 2004), lo cuál ha contribuido a que durante la última década se haya extendido notablemente el empleo de esta técnica en campos de tan diversa índole como el diagnóstico clínico (Quaresima *et al.*, 2003), la industria farmacéutica (Reich, 2005), la industria bioquímica (Chen *et al.*, 2005) y la industria alimentaria, utilizándose en este caso para el análisis de productos tan diversos como la leche (Sivakesava & Irudayaraj, 2002), el pescado (Cozzolino *et al.*, 2005), patata (López *et al.*, 2013) o la carne (Prieto *et al.*, 2006), entre otros.

2.2.2 PRINCIPIOS DE LA TECNOLOGÍA NIRS

La espectroscopía en el infrarrojo cercano es una técnica que forma parte del campo de estudio de la espectroscopía molecular, la cuál estudia la interacción de la radiación electromagnética con la materia (Heise *et al.*, 2002). La materia está constituida por moléculas formadas a su vez por átomos que están unidos por distintos tipos de enlaces. En una molécula, los átomos no ocupan posiciones fijas sino que se encuentran en constante movimiento y vibran dentro de un determinado espacio que normalmente es su estado vibracional más bajo E_0 . Para la realización de estos cambios de posición de los elementos de una molécula se requiere la absorción de cierta cantidad de energía que oscila alrededor de una frecuencia de 1013Hz, que se corresponde con la región espectral del infrarrojo cercano (NIR). Cuando la frecuencia de vibración coincide con la radiación electromagnética, aumenta el estado vibracional pasando de E_0 a E_1 . Con la tecnología NIRS se irradia una muestra, con una o varias bandas de longitud de onda comprendidas entre 780 y 2500 nm, la radiación penetra en la muestra, se excitan los modos de vibración de las moléculas y posteriormente es reflejada en todas las direcciones produciéndose un espectro de reflectancia que depende de la composición de la muestra (Skoog y Leary, 1996).

De esta forma, el espectro electromagnético resultante, que se define como la representación gráfica de la interacción de la radiación electromagnética con la materia, abarca la energía contenida en fotones (unidades portadoras de radiación) desde longitudes de onda de varios metros de longitud hasta inferiores a los 0,02 nm. Por esta razón, se divide en diferentes regiones, denominadas regiones espectrales, entre las cuáles se encuentra definido el NIR. Como punto de referencia obligado, el espectro electromagnético global comprende la radiación visible detectable por el ojo humano, aproximadamente entre los 400 y los 750 nm. Las ondas de menor frecuencia y longitud de onda más larga se encuentran situadas a la izquierda (Ondas de radio), mientras que aquellas con la frecuencia más alta y longitud de onda más corta se localizan a la derecha (Rayos Gamma).

En cuanto a la radiación infrarroja se refiere, pueden diferenciarse tres zonas distintas: el infrarrojo cercano, que abarca radiaciones con longitudes de onda comprendidas entre los 750 nm y los 2500 nm; el infrarrojo medio, desde los 2500 a los 50 000 nm; y el infrarrojo lejano, entre los 50 000 nm y 1 mm (Osborne y Fearn, 1986).

Estudios más detallados sobre el fundamento de la espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano, así como una descripción exhaustiva de los diferentes tratamientos matemáticos y estadísticos que se llevan a cabo para obtener la mejor ecuación de predicción, se pueden encontrar en los trabajos de Williams y Norris (2001). Por lo tanto, y dado que ya

existen extensas revisiones sobre los fundamentos de esta tecnología, el presente trabajo se centra más en su aplicación a la calidad de la carne.

En este sentido, son numerosos los trabajos que describen la capacidad de la tecnología NIRS para estimar el contenido de los distintos parámetros de interés en muestras de carne.

2.2.3 VENTAJAS Y DESVENTAJAS DEL NIRS

Las principales ventajas de la espectroscopía NIR como herramienta de análisis cualitativo y cuantitativo son (Eliécer *et al.*, 2001):

- Es una técnica no destructiva ni invasiva.
- La preparación de la muestra es sencilla y la medida se realiza con rapidez. La posibilidad de realizar medidas tanto en estado sólido como líquido ha permitido minimizar la manipulación previa de la muestra por parte del analista y realizar un número elevado de análisis, aspecto muy importante en lo referente al control de calidad.
- Bajo coste del análisis. La ausencia de reactivos y de cualquier otro tipo de material para la preparación de las muestras hace que los costes de aplicación de la técnica sean mínimos. Por otro lado, al ser un análisis automático y de gran rapidez produce un aumento de la capacidad analítica del laboratorio. Esto hace que la inversión inicial sea rápidamente amortizada.
- La técnica permite la determinación de varios analitos de la muestra sin tener que seguir un procedimiento analítico diferente para cada uno de ellos. Esta posibilidad implica invertir mucho tiempo cuando se ponen a punto las calibraciones, pero permite la posterior automatización del análisis.
- Es posible determinar parámetros no químicos de una muestra, puesto que con frecuencia los datos espectrales están afectados por parámetros físicos.
- La resistencia de los materiales utilizados y la ausencia de partes móviles en el sistema de detección hacen que sea una técnica idónea para procesos de control en planta. Esta aplicación se ve favorecida por la gran tendencia a la miniaturización y compactación que está sufriendo esta instrumentación.
- En muchos campos de aplicación, la exactitud de la técnica NIR es comparable a otras técnicas analíticas y, generalmente, su precisión es mayor debido a la falta de tratamiento de la muestra.

Sin embargo, el método también presenta ciertas desventajas como son (Garrido, 1999):

- La adquisición del espectrofotómetro NIR es comparativamente cara.

- La complejidad de la señal NIR obliga a aplicar técnicas quimiométricas que permitan modelar los datos y cuantificar muestras problema.
- La preparación del calibrado es dificultosa, ya que es necesario disponer de muestras para ampliar el intervalo de concentración de las muestras problema (habitualmente representan un intervalo de concentración demasiado estrecho). Además, éstas deben representar características físicas y químicas similares a las reales.
- No es posible analizar muestras problema que presenten una variabilidad (física o química) no contemplada en la calibración.
- La técnica es poco sensible, especialmente en medidas de reflectancia difusa, imposibilitando, en general, el análisis de componentes minoritarios.
- Presenta dificultades en la transferencia de calibraciones entre diferentes instrumentos, puesto que pequeñas diferencias entre ellos puede dar lugar a errores importantes en los resultados, y obligar esto a que, para analizar una misma muestra problema, sea necesario preparar un calibrado en cada instrumento.

2.2.4 QUIMIOMETRÍA Y ANÁLISIS MULTIVARIANTE

Se define quimiometría como la disciplina química que emplea métodos estadísticos y matemáticos para diseñar o seleccionar de forma óptima procedimientos de medida y experimentos y para aportar la máxima información química a partir de los datos analizados (Otto, 1999); si bien esta y otras definiciones pueden verse modificadas con el tiempo según la evolución del desarrollo tecnológico.

El concepto de quimiometría fue introducido por diversos grupos de investigación en química analítica y química física orgánica, a finales de 1960 y durante la década de 1970. Se considera que el término se empleó por primera vez por Svante Wold y Bruce R. Kowalski en 1972 (Wold *et al.*, 1972; Kowalski *et al.*, 1972) para intentar superar las limitaciones impuestas por la estadística univariante en diseño experimental, clasificación y calibración multivariante.

Una idea genérica en el uso de la quimiometría es que las matrices de datos incluyen información redundante que puede ser reducida sustancialmente. Por otro lado, no se entiende esta disciplina sin una etapa de visualización de datos mediante el empleo de gráficos y figuras (Geladi, 2003).

Por lo tanto, el análisis de datos multivariante (multidimensional o multicanal), como parte principal de la quimiometría, se hace indispensable para el desarrollo de aplicaciones cuantitativas o cualitativas en espectroscopia NIR, que en algunas ocasiones maneja matrices

de datos en las que cada objeto (muestra) presenta más de 1000 variables (valores de absorbancia).

El análisis multivariante podría definirse como los diferentes métodos, ya sean estadísticos, matemáticos o gráficos, empleados en el análisis de datos, siempre y cuando se consideren para dicho análisis varias variables de forma simultánea (Martens y Næs, 1989; Martens y Martens, 2000; Næs *et al.*, 2002). En el caso de la tecnología NIRS, el análisis multivariante se empleará para estimar cualquier propiedad de la muestra (físico-química, fundamentalmente) a partir de múltiples variables espectrales (valores de absorbancia a diferentes longitudes de onda).

2.2.4.1 Estudios cuantitativos

En el análisis cuantitativo, el más extendido dentro de las aplicaciones de la tecnología NIRS, se estima la concentración de un analito en una determinada muestra. Para ello se ha de establecer la relación (ecuación matemática) existente entre los valores de absorbancia en la región NIR y la concentración de dicho analito, determinada mediante un método de referencia, en muestras de composición conocida. Este proceso se conoce con el nombre de etapa de calibración, a la relación matemática desarrollada se le denomina ecuación de calibración y al grupo de muestras de composición se designa como colectivo de calibración. Una vez establecida la ecuación de calibración, ésta permite predecir el contenido de otras muestras similares en características a las incluidas en el colectivo de calibración (Williams y Sobering, 1996; Shenk y Westerhaus, 1995b y 1996).

Conviene indicar que el proceso de obtención de ecuaciones de calibración, desde este punto de vista simplificado, puede parecer sencillo. Sin embargo, el desarrollo de ecuaciones de calibración NIR globales o universales y robustas, es decir, ecuaciones que puedan ser de aplicación en la práctica totalidad de las muestras de una población y asimismo que mantengan su exactitud y precisión a lo largo del tiempo, requiere del seguimiento de unas estrategias concretas, algunas de las cuales se indicarán a continuación (Shenk y Westerhaus, 1995a y 1996).

Una etapa de gran importancia en el desarrollo de una ecuación de calibración NIRS es la selección de muestras que van a constituir el colectivo de calibración. En general, mientras mayor sea el número de muestras que constituyan el colectivo de calibración, mayor capacidad de predicción presentará una ecuación. Sin embargo, dado que dichas muestras han de ser analizadas mediante el método de referencia, que suele ser lento y costoso, el número de dichas muestras a emplear suele ser limitado. Por otra parte, ha quedado demostrado que, además de su número, un aspecto muy importante es la variabilidad, tanto

espectral como química que cubran dichas muestras (Shenk y Westerhaus, 1991, 1995b y 1996; Næs e Isaksson, 1989; Isaksson y Næs, 1990).

Si lo que se pretende es desarrollar una ecuación NIRS global, las muestras del colectivo de dicha calibración han de ser representativas del producto a analizar, abarcar la variabilidad existente, en cuanto a composición se refiere, de dichas muestras y contener todas las fuentes de variación que es posible esperar en el análisis de muestras futuras (variabilidad debida a ciclos de producción, origen de las muestras, etc.). A los colectivos de muestras que cumplen estos objetivos se les suele denominar, dentro de la terminología NIR, librerías espectrales universales o globales de un producto (Shenk y Westerhaus, 1991 y 1995b).

Hoy en día se han propuesto numerosos métodos de selección de muestras para constituir el colectivo de calibración (Næs e Isaksson, 1989; Isaksson y Næs, 1990) e incluso, en algunos de los programas de tratamiento quimiométrico de espectros NIR, se suelen incorporar herramientas para la construcción, estructuración y selección de muestras representativas de una librería espectral NIR (Esbensen *et al.*, 1994; Shenk y Westerhaus, 1995a y 1996). La mayoría de dichas herramientas se basan en la realización de un análisis de componentes principales (ACP), seguido del cálculo de distancias entre muestras (espectros) en un espacio n-dimensional, a través generalmente de la distancia de Mahalanobis (Shenk y Westerhaus, 1995a, 1996).

Una vez seleccionadas las muestras de calibración, analizadas mediante el método de referencia y NIR, y seleccionadas las variables espectrales a considerar (longitudes de onda seleccionadas, componentes principales, etc.), la siguiente etapa a considerar es el desarrollo en sí del modelo matemático que relacione ambos tipos de datos.

Para ello existen diferentes métodos de regresión (Martens y Næs, 1989; Burns y Ciurczak, 1992; Puigdomenech, 1998; Næs *et al.*, 2002), siendo los más utilizados en las aplicaciones cuantitativas NIR la regresión lineal múltiple (RLM ó MLR), la regresión por componentes principales (RCP ó PCR) y la regresión mediante mínimos cuadrados parciales (RMCP ó PLS). La regresión RLM, en sus diferentes variantes (Shenk y Westerhaus, 1995b, 1996; Puigdomenech, 1998), lleva a cabo una regresión a partir de un pequeño número de variables espectrales seleccionadas de entre todo el espectro NIR. Dichas longitudes de onda, seleccionadas mediante un test F, son aquellas que presentan una mayor correlación entre el valor de absorbancia a una longitud de onda determinada y el dato de composición química.

Los métodos de regresión RCP y RMCP se asemejan en sus fundamentos, ya que, mediante ambos métodos se pretende generar unas nuevas variables, combinación lineal de los datos espectrales originales y emplear estas nuevas variables en el desarrollo de la ecuación de

regresión (Martens y Næs, 1989; Shenk y Westerhaus, 1995b; Martens y Martens, 2000). Así, únicamente es considerada en el desarrollo de la regresión aquella información presente en los datos espectrales realmente relevante.

La principal diferencia entre ambos se basa en el tipo de combinaciones lineales que construyen a partir de los datos originales. Mientras la regresión en componentes principales (RCP) emplea los valores de las componentes principales, la regresión por mínimos cuadrados parciales (RMCP) construye unos factores RMCP. Estos factores RMCP se seleccionan de forma tal que expliquen el mayor porcentaje de variabilidad, no solo en los datos espectroscópicos, como en el ACP, si no asimismo la mayor variabilidad en los datos de composición química. (Martens y Næs, 1989; Shenk y Westerhaus, 1995 a, Næs *et al.*, 2002).

Durante el desarrollo de una ecuación de calibración NIR, siempre se observa la presencia de determinadas muestras que, por diversos motivos, presentan un comportamiento diferente al resto de muestras presentes en el colectivo de calibración. A estas muestras se les denomina anómalas (outliers). La anomalía puede ser causada tanto por la información espectroscópica como por la química. La detección, interpretación y posible eliminación de estas muestras anómalas es una etapa crítica en el desarrollo de una ecuación de calibración, debido a la gran influencia que provoca su presencia en los resultados del modelo.

Después de haber desarrollado una ecuación de calibración mediante alguno de los métodos de regresión existentes, es esencial determinar su capacidad de predicción de muestras que no hayan intervenido en la calibración. Este proceso se denomina etapa de validación (o validación externa), mientras que las muestras empleadas en dicha etapa se designan como colectivo de validación. En la validación externa, se utiliza un conjunto de muestras independientes a las utilizadas en el calibrado, pero representativo del mismo y de las futuras muestras a analizar, denominado conjunto de validación. La concentración de las muestras del bloque de validación es conocida y, por lo tanto, es posible comprobar cómo se comporta el modelo propuesto en el cálculo de concentraciones de muestras distintas a las utilizadas en la construcción del mismo.

Una variante de la validación descrita anteriormente es la denominada validación cruzada. Esta técnica, descrita por Stone (1974), consiste en una validación basada únicamente en los datos empleados en la etapa de calibración. Para ello, se eliminan de forma sucesiva muestras del colectivo de calibración que son empleadas para validar la ecuación desarrollada a partir del resto de muestras del colectivo de calibración que no han sido eliminadas. El procedimiento se repite hasta lograr que todas las muestras hayan sido utilizadas una vez para realizar la validación. Con ello se logra obtener una estimación de la capacidad de predicción de una ecuación más real que la obtenida durante el desarrollo del modelo de calibración.

Desde el punto de vista estadístico, la etapa de validación consiste en la comparación, mediante diferentes criterios estadísticos, del valor verdadero y el valor estimado (Massart *et al.*, 1988).

Particularizando en la tecnología NIRS, se considerará como valor verdadero aquel determinado mediante el método de referencia mientras que el valor estimado será aquel predicho por la ecuación de calibración NIR.

2.2.4.2 Estudios cualitativos

El análisis cualitativo NIR consiste en la comparación de espectros de muestras desconocidas con grupos de espectros NIR de muestras de características conocidas (Mark, 1992). Estas características o atributos, variables categóricas y no continuas, pueden ser, a modo de ejemplo, el origen geográfico, variedad, tipo de producto, tipo de alimentación, etc.

Se han desarrollado numerosos métodos quimiométricos multivariantes para poder llegar a establecer un análisis cualitativo a partir de datos químicos (Massart *et al.*, 1997), habiéndose aplicado la mayoría de ellos a datos espectrales NIR (Mark, 1992; McClure, 1992; Bertrand, 1993; Kaffka y Giamarti, 1995; Downey, 1996 y 2000; Martens y Martens, 2000; Dardenne, 2000; Næs *et al.*, 2002). Incluso, algunos de dichos algoritmos ya fueron incorporados en las primeras versiones de los programas informáticos para la recogida y tratamiento estadístico de espectros NIR (Mark, 1992).

Todos los métodos de clasificación o de reconocimiento de pautas se podrían agrupar en dos grandes categorías: supervisados y no supervisados. Ambos se diferencian en el nivel de información que se disponga a priori del agrupamiento existente en los datos (Massart *et al.*, 1997).

Así, si no se dispone de alguna información o es escasa acerca de los grupos (categorías) existentes en las muestras analizadas, los métodos se denominarán no supervisados. El principal objetivo de estos métodos es poder identificar tendencias al agrupamiento de las muestras disponibles, sin necesidad de disponer de ningún tipo de información adicional acerca de ellas nada más que sus datos espectrales (Bertrand y Dufour, 2000; Downey, 1996 y 2000; Næs *et al.*, 2002). Por ello, estos métodos suelen ser aplicados en las primeras etapas de la investigación o exploración de los datos. Un ejemplo de dichos métodos es el análisis cluster y sus diferentes variantes (Massart *et al.*, 1997), si bien dentro de esta categoría también se puede incluir al análisis de componentes principales (ACP) (Næs *et al.*, 2002).

A diferencia de los métodos no supervisados, en los métodos supervisados, frecuentemente empleados en análisis cualitativo NIR, sí se dispone de información acerca de los grupos o categorías existentes en el colectivo de muestras. El principal objetivo de este tipo de métodos es el de generar diferentes reglas o modelos de clasificación para un número determinado de clases o grupos de muestras analizadas (Massart *et al.*, 1997; Bertrand y Dufour, 2000; Downey, 1996 y 2000; Næs *et al.*, 2002). Para ello se parte de un conjunto de muestras, denominado grupo de aprendizaje, del que se dispone tanto de los datos espectrales NIR como de la información de la variable categórica (origen, procedencia, variedad), estableciéndose a partir de ellos una función que correlacione a ambos tipos de datos.

Se ha de destacar que, la principal diferencia del análisis cualitativo con el análisis cuantitativo anteriormente descrito es que, en este caso, no es preciso disponer de ningún dato químico adicional al dato espectroscópico NIR, por lo que el colectivo de aprendizaje sólo está constituido por información espectral NIR, de ahí que se pueda denominar análisis espectral *per se*.

Una vez generados los modelos o reglas de clasificación, estos son empleados para asignar nuevas muestras, de características desconocidas, a aquella categoría a la que presente mayor semejanza o similitud en términos estadísticos. Dicha similitud suele expresarse en términos de distancia en un espacio n-dimensional. Existen diferentes estadísticos para poder expresar esta distancia como son la distancia euclídea, de Mahalanobis, de Manhattan, de Minkowski, etc. (SAS, 1990; Massart *et al.*, 1997; De Maesschalck *et al.*, 2000). También puede evaluarse la similitud en términos de probabilidad de pertenencia a una categoría (Mark, 1992; Massart *et al.*, 1997).

El análisis cualitativo también puede ser utilizado como herramienta en la interpretación de diferencias entre grupos de muestras, en la localización de bandas de absorción características de grupos funcionales, en la detección de zonas de máxima diferencia entre dos productos, etc. (Williams y Norris, 1987; Downey, 1996 y 2000; Martens y Martens, 2000; Næs *et al.*, 2002).

Entre los métodos de clasificación supervisados, los de mayor aplicación a datos espectrales NIR son el análisis discriminante lineal (ADL) y cuadrático (ADC), análisis discriminante canónico (o análisis discriminante lineal de Fisher), análisis SIMCA (Soft Independent Modelling of Class Analogies), análisis mediante redes neuronales artificiales, análisis KNN (K nearest neighbours) y análisis discriminante mediante regresión RMCP o RCP (Martens y Næs, 1989; Mark, 1992; Downey 1996; Bertrand y Dufour, 2000; Næs *et al.*, 2002).

La idea básica de la aplicación de la tecnología NIRS para resolver problemas de autenticación se basa en la generación de la huella espectral de los alimentos (Downey, 1996). Un alimento con una composición química determinada, expuesto a radiación NIR, tendrá un espectro característico como resultado de la absorción de varios componentes químicos, aunque las propiedades físicas puedan tener un impacto en esos valores de absorbancia.

Es importante destacar la necesidad de aplicar métodos quimiométricos para la interpretación del espectro característico de cada alimento o producto.

La tecnología NIRS también ha demostrado tener potencial para determinar la autenticidad de alimentos y de ingredientes (Cozzolino & Murray, 2004). Problemas de autenticidad alimentaria, especialmente en términos de la adulteración y el etiquetado o descripción incorrecta, probablemente han existido desde que se pusieron alimentos a la venta. En los últimos años, la adulteración de los alimentos es cada vez más sofisticada (Karoui & De Baerdemaeker, 2007). Los alimentos o ingredientes alimentarios de alto valor y que se someten a tratamientos, generalmente son más propensos a ser objeto de adulteración ya que se pueden sustituir ingredientes por otros de menor calidad y valor. Por ello, la tecnología NIRS se perfila como una solución viable para la detección de dichas adulteraciones.

2.2.5 APLICACIÓN DE LA TECNOLOGÍA NIRS EN CARNE Y PRODUCTOS CÁRNICOS

El desarrollo y aplicación de la tecnología NIRS es relativamente reciente, sobre todo en el sector de los productos cárnicos. Así, los primeros ensayos con este tipo de productos fueron llevados a cabo hace cuatro décadas (Ben Gera y Norris, 1968), desarrollando una aplicación NIR para predecir humedad y grasa en productos cárnicos mediante análisis por transmitancia. No obstante, la confirmación de la aptitud de esta tecnología mediante numerosos trabajos de investigación en cárnicos no se llevó a cabo hasta hace casi dos décadas (Byrne *et al.*, 1998). En la actualidad, es una realidad la viabilidad de aplicación de la tecnología NIRS en el análisis on-line en tiempo real, tanto desde un punto de vista predictivo, como para la autenticación y diferenciación de calidades.

La mayor parte de los trabajos efectuados han tratado sobre la capacidad de la tecnología NIRS para predecir la composición química en diferentes sistemas productivos (ovino, porcino, vacuno, aves, etc.), principalmente en análisis de parámetros mayoritarios (grasa, humedad y proteína), existiendo menos literatura relacionada con la capacidad de la tecnología NIRS para evaluar la calidad de la carne mediante cuantificación o detección de

características tecnológicas, sensoriales o categorización en grados de calidad (Prevolnik *et al.*, 2004).

En lo que respecta a la carne y los productos cárnicos, los problemas de autenticidad se encuentran, principalmente, en la sustitución completa o parcial de materias primas de alto valor, por otras de menor valor. Entre estas se pueden incluir cortes más baratos del mismo animal o de animales de otras especies, despojos, sangre, agua, huevos, gluten u otras proteínas de origen animal o vegetal (Cordella *et al.*, 2002). Otro problema relacionado sería el poder diferenciar carne previamente congelada de carne fresca. En algunos países, la legislación prohíbe de manera específica la adulteración de carne de una especie con otra. Además, hay que tener en cuenta que el consumo de algunas carnes puede estar prohibida por motivos religiosos.

En estudios realizados anteriormente, la tecnología NIRS ha resultado ser útil para diferenciar carne de canguro y de ternera (Ding and xu, 1999); carne de cerdo, pollo y pato (Rannou & Downey, 1997); cortes de carne de pollo (Fumière *et al.*, 2000); mezclas de carne de cordero y ternera (McElhinney *et al.*, 1999); y ternera, cerdo y pollo (Downey *et al.*, 2000); y para identificación y autenticación de carne cruda de diferentes especies como cerdo, pollo, cordero y ternera (Cozzolino & Murray, 2004).

En la figura 2.3 se presentan los espectros típicos de absorción de carne de ternera, cerdo, pollo y cordero.

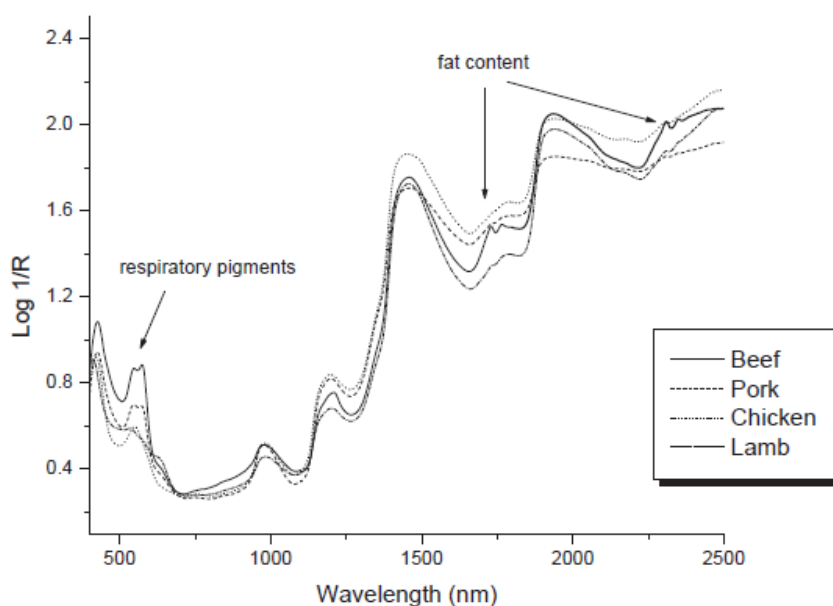


Figura 2.3. Espectros de absorción típicos de carne de ternera, cerdo, pollo y cordero. Fuente: Cozzolino & Murray, 2004.

2.2.5.1 Composición química

La composición química de la carne es variable y determina la calidad de la misma, lo que repercute en la dieta humana por la variedad de nutrientes que aporta. Además, la composición química de la carne afecta a su calidad tecnológica, higiénica, sanitaria y sensorial. Debido a la importancia de la composición química de la carne, es importante ser capaces de medirla de una forma rápida y fiable.

En las últimas décadas se han publicado numerosas aplicaciones para la determinación de la cantidad de agua, proteína y grasa de la carne y los productos cárnicos, mediante el uso de espectroscopía en el infrarrojo cercano. Así, por ejemplo, se han llevado a cabo estudios sobre composición química en carne de vacuno (Eichinger y Beck, 1992; Tøgersen *et al.*, 1999; Rødbotten *et al.*, 2000; Cozzolino *et al.*, 2002; Alomar *et al.*, 2003; Tøgersen *et al.*, 2003; Prieto *et al.*, 2009), ovino (Young *et al.*, 1996; Cozzolino *et al.*, 2000; Viljoen *et al.*, 2007), porcino (Tøgersen *et al.*, 1999; Brøndum *et al.*, 2000; Kestens *et al.*, 2008) y carne de pollo (Cozzolino *et al.*, 1996; Renden *et al.*, 1986; Valdes y Summers, 1986; Abeni y Bergoglio, 2001; Berzaghi *et al.*, 2005). También se pueden encontrar, aunque en menor medida, trabajos con carne de conejo (Masoero *et al.*, 1994). La mayoría de estos estudios han sido encaminados a la predicción de uno o más componentes tales como la proteína, grasa intramuscular y agua (Cozzolino *et al.*, 1996; Tøgersen *et al.*, 1999; Cozzolino *et al.*, 2000). En el músculo, existe una relación inversa altamente significativa entre los contenidos de grasa y agua ($r=-0,99$) y de grasa y proteína ($r=-0,93$). La suma de estos tres componentes (proteína, grasa intramuscular y agua) en el músculo es bastante constante, generalmente entre el 97 y 99% de la masa muscular. Por lo tanto, según Downey y Hildrum (2004) la estimación de cada uno de estos componentes mediante tecnología NIRS no es independiente, sino que cada una de las calibraciones tiene en cuenta las relaciones entre ellos.

2.2.5.1.1 Agua

El agua es un componente variable de la carne y de los productos cárnicos que puede representar hasta un 75% de la materia fresca total. La mayoría de los estudios reflejan una buena capacidad de predicción de agua mediante tecnología NIRS. Así, por ejemplo, trabajos como los de Viljoen *et al.*, (2007) con carne de cordero, Solís *et al.*, (2001) con lomo de cerdo ibérico o Van Kempen (2001) en carne de vacuno, constataron que los datos espectrales permitían explicar más del 95% de la variación relacionada con el contenido de agua de las muestras. También fueron descritos resultados satisfactorios por Lanza (1983) en carne cerdo y vacuno ($R^2=0,87-0,96$) y Mitsumoto *et al.*, (1991) en carne de vacuno ($R^2=0,80-0,89$).

Es importante destacar que la forma de presentación de las muestras influye en la capacidad de predicción de los modelos matemáticos. Así, Kruggel *et al.*, (1981) observaron que en muestras de carne de vacuno emulsionada la correlación entre el contenido de materia seca y los datos de absorbancia NIR ($R^2=0,81-0,88$) era más elevada que en muestras de carne de ovino picada ($R^2=0,49-0,72$), debido a una homogeneidad superior de las muestras emulsionadas. En este sentido, estudios como los realizados por Cozzolino *et al.*, (1996), Cozzolino *et al.*, (2000) y Cozzolino y Murray (2002) evidencian la conveniencia de utilizar las muestras picadas en vez de intactas para recoger los datos espectrales y estimar el contenido de humedad, debido a una falta de homogeneidad de estas últimas.

En la literatura científica también se pueden encontrar trabajos en los que la estimación de este parámetro no ha sido del todo fiable. Este es el caso de Brøndum *et al.*, (2000) en muestras de carne porcina, de Alomar *et al.*, (2003) en muestras de carne de vacuno, de Cozzolino *et al.*, (2000) en muestras de carne de cordero, o de Viljoen *et al.*, (2005) en muestras de carne de avestruz picadas y liofilizadas. Todos ellos obtuvieron ecuaciones de predicción del contenido de materia seca con coeficientes de determinación inferiores a 0,72. Esto puede ser debido, en parte, a la precisión del método de referencia. Además, los cambios en el contenido de humedad que tienen lugar durante la preparación de la muestra pueden dar lugar a una falta de correspondencia entre el valor determinado analíticamente y los datos espectrales. Por esta razón, lo más conveniente con el fin de evitar las pérdidas por evaporación, es escanear las muestras y analizarlas inmediatamente después mediante el método de referencia. Otros aspectos como son un número elevado de muestras utilizadas en la calibración, un rango amplio de variación en el contenido de humedad (Alomar *et al.*, 2003), o muestras suficientes en los extremos de rango (Viljoen *et al.*, 2005) pueden ser claves para obtener resultados satisfactorios empleando la tecnología NIRS.

2.2.5.1.2 Grasa

En cuanto a la predicción del contenido de grasa (en concreto, de grasa bruta) en muestras de carne mediante la utilización de la tecnología NIRS, este parámetro ha sido estimado, en general, con una gran exactitud. Así, por ejemplo, Viljoen *et al.*, (2007) en carne de cordero, Solís *et al.*, (2001) y Prevornik *et al.*, (2005) en cerdos ibéricos o Lanza (1983) en carne de vacuno y porcino obtuvieron ecuaciones de predicción con elevados coeficientes de determinación ($R^2=0,99$) entre el contenido de grasa bruta de las muestras y los datos espectrales. Sanderson *et al.*, (1997) y Park *et al.*, (1998) también obtuvieron resultados muy buenos en muestras de carne de vacuno ($R^2=0,95$ y $0,90$, respectivamente). Estudios realizados con carne de pollo (Abeni y Bergoglio, 2001; Valdes y Summers, 1986) y con carne de avestruz picada y liofilizada (Viljoen *et al.*, 2005) también han constatado la validez de este procedimiento para estimar el contenido de grasa bruta.

De la misma manera que en el caso del agua, la forma de presentación de las muestras para obtener el espectro infrarrojo influye directamente en la exactitud de las estimaciones obtenidas. Así, Hoving- Bolink *et al.*, (2005) sólo obtuvieron estimaciones exactas de este parámetro en muestras de carne de cerdo intactas cuando ampliaron la superficie escaneada y redujeron así el error de muestreo. Posteriormente, Isaksson *et al.*, (1996) observaron que, las estimaciones del contenido de grasa bruta más exactas se obtenían con la carne picada al tamaño más pequeño (4 u 8 mm). Con la carne picada a 13 mm de diámetro, las ecuaciones fueron todavía aceptables, pero no a 19 mm. Estos resultados coinciden con lo descrito por Tøgersen *et al.*, (1999, 2003) en carne fresca de porcino y vacuno y en muestras de vacuno procedentes de carne congelada, respectivamente. Posiblemente, este efecto negativo a medida que aumentaba el tamaño de partícula de la carne se debió a la mayor heterogeneidad de las muestras, que daban lugar a un error de muestreo más elevado.

Tanto Cozzolino *et al.*, (2000), como Cozzolino y Murray (2002) y Prevolnik *et al.*, (2005) más tarde, lograron mejorar las predicciones del contenido de grasa bruta en carne de cordero, ternera y cerdo, respectivamente, al picar las muestras.

Alomar *et al.*, (2003), por su parte, indicaron que un número elevado de muestras en la calibración y un rango amplio del parámetro químico de interés también ayudan a obtener predicciones más exactas. Esto coincide con lo descrito por Kruggel *et al.*, (1981), quienes obtuvieron estimaciones más exactas del contenido de grasa bruta con muestras picadas de carne de vacuno ($R^2=0,83-0,88$; $EEC=1,88-2,34\%$ MS) que con muestras de carne de ovino picadas con un tamaño de poro mayor ($R^2=0,66-0,72$; $EEC=2,41-2,99\%$ MS), posiblemente debido a una mayor homogeneidad y a un rango más amplio de este parámetro en las primeras.

2.2.5.1.3 Proteínas

Hay varios estudios que han obtenido buenos resultados utilizando la tecnología NIRS para estimar el contenido de proteína bruta en muestras de carne. Por ejemplo, estudios como el de Masoero *et al.*, (1994) comprobaron que los datos espectrales explicaban un 93% de la variabilidad relacionada con este parámetro en muestras de lomo de conejo. Alomar *et al.*, (2003) y Calvo *et al.*, (1997) obtuvieron a su vez resultados aceptables en muestras de carne de vacuno ($R^2=0,82$) y ovino ($R^2=0,85$), respectivamente.

Es importante tener en cuenta que, también en este caso, la forma de presentación de las muestras influye en la exactitud de las estimaciones obtenidas. Por ejemplo, Isaksson *et al.*, (1996) recogieron los datos espectrales (con una sonda de fibra óptica en la línea de sacrificio)

de muestras de carne de vacuno picadas a distintos tamaños. Estos autores pudieron comprobar que las mejores predicciones de proteína bruta se obtuvieron cuando las muestras de carne fueron picadas con un tamaño pequeño, ya que eran más homogéneas y esto permitía reducir los errores de muestreo. Existen otros trabajos que evidencian la conveniencia de utilizar muestras de carne picada para estimar el contenido de proteína bruta con respecto a las muestras intactas (Cozzolino *et al.*, 1996; Cozzolino *et al.*, 2000; Cozzolino y Murray, 2002).

No obstante, y a pesar de que la forma de presentación fue apropiada en muchos casos (muestras emulsionadas, picadas), el porcentaje de variación explicado por los datos espectrales ha sido inferior al 80% en muchos de los trabajos consultados (Krugger *et al.*, 1981; Lanza, 1983; Sanderson *et al.*, 1997; Abeni y Bergoglio, 2001; Solís *et al.*, 2001; Tøgersen *et al.*, 2003). Los autores de estos trabajos han atribuido el fracaso de estas predicciones a factores tales como el error de muestreo mencionado anteriormente, los errores procedentes de la inexactitud del método de referencia o el rango relativamente estrecho del parámetro de interés, en este caso la proteína bruta.

3. OBJETIVOS

El objetivo general del presente Trabajo Fin de Máster fue establecer un método para la autenticación de muestras de carne de cordero y ternera mediante espectroscopia NIR a través del análisis de sus espectros de reflectancia. Para ello, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- 1) Obtener el espectro de reflectancia característico de cada especie (cordero y ternera), identificando los picos de absorción con los grupos funcionales.
- 2) Clasificar las muestras según el tipo de alimentación por medio de quimiometría de los espectros NIRS.
- 3) Autenticar las muestras de ambas especies (cordero y ternera), mediante tecnología NIRS, detectando adulteraciones previamente realizadas con carne de cerdo, potro, toro y pollo en distintos porcentajes.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 MATERIAL ANIMAL

Para realizar este estudio se utilizaron muestras de carne de cordero, ternera, cerdo, pollo, toro de lidia y carne de potro. Dicha carne se encontraba previamente congelada y almacenada en las instalaciones de la Universidad Pública de Navarra.

Se realizaron tres experimentos con el mismo espectrofotómetro NIR para dar respuesta a cada uno de los objetivos planteados.

Para el estudio del espectro característico de carne de cordero y de ternera, se emplearon un total de 70 muestras de cordero y 46 de ternera (Experimento 1). Dichas muestras pertenecían a animales a los que se les había administrado distintas dietas (Experimento 2).

Para el estudio de la identificación de los diferentes grupos de alimentación en carne de ternera, se emplearon las mismas 46 muestras, de tal manera que 14 eran las muestras control (terneros alimentados con cebada), 16 muestras pertenecían a terneros alimentados con lino y 16 muestras provenían de terneros alimentados con lino + vitamina E. Las medidas se realizaron sobre carne intacta (sin picar).

Para la clasificación de las muestras de cordero en función de la alimentación, se utilizaron un total de 70 muestras, de las cuales 22 eran muestras control (corderos alimentados con cebada), 22 de corderos alimentados con lino, 11 muestras de corderos alimentados con chia, y 15 muestras de corderos alimentados con lino más algas. Se realizaron un total de 4 medidas por cada muestra, por lo que se obtuvieron un total de 280 espectros de reflectancia (tabla 4.1).

Tabla 4.1. Estudio del efecto de la alimentación en corderos.

Tipo Alimentación	Nº Muestras	Nº medidas NIR	Total Espectros
Control	22	4	88
Lino	22	4	88
Chia	11	4	44
Lino + Algas	15	4	60
Total	70		280

En los grupos de carne de ternera, se realizaron 4 medidas con el equipo NIR en cada muestra, por lo que se obtuvieron un total de 184 datos para el análisis (tabla 4.2).

Tabla 4.2. Estudio del efecto de la alimentación en ternera.

Tipo Alimentación	Nº Muestras	Nº medidas NIR	Total Espectros
Control	14	4	56
Lino	16	4	64
Lino + Vitamina E	16	4	64
Total	46		184

4.2 ESPECTROFOTÓMETRO

Los espectros de reflectancia se obtuvieron mediante un espectrofotómetro NIR Luminar 5030 Miniature “Hand-held” (Figura 4.1.a). Este equipo utiliza la tecnología AOTF (Filtro Acusto-Óptico Sintonizable). Tiene un detector InGaAs y el fundamento básico de su funcionamiento es el siguiente: un haz de luz se dirige hacia la muestra, penetra en la misma y la luz no absorbida por dicha muestra es reflejada y recogida por el detector que envía la información al ordenador, tal y como se indica en la Figura 4.1.b

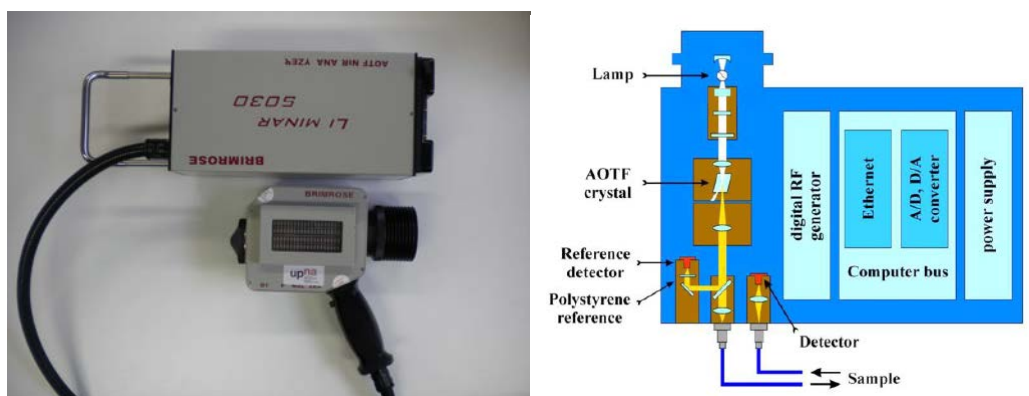


Figura 4.1. a) Analizador NIR Luminar 5030. Brimrose. b) Esquema de funcionamiento del analizador luminar 5030. Fuentes: a)UPNA; b)www.brimrose.com.

El rango de longitud de onda empleado para la medición fue de 1100 a 2300 nm, a intervalos de 2 nm. La velocidad de escaneado fue de 16.000 longitudes de onda por segundo. Para realizar una medición, el espectrofotómetro toma 50 espectros y proporciona el espectro medio. El área de muestreo es un círculo de 5 mm para el caso de muestras sólidas.

Antes de medir, se realiza la calibración del espectrofotómetro con una muestra, de forma que la ganancia energética del amplificador interno (relación adimensional entre la energía obtenida a la salida y a la entrada) se encuentre entre los valores 33.000 y 66.000 (Brimrose, 1997; Cuesta, 1991).

4.3 TOMA DE MEDIDAS

Las muestras a medir se descongelaron en cámara frigorífica la víspera de la realización de las medidas. Todas las muestras que se procesaron en una misma sesión se colocaron en sus bandejas y sobre bolsas de hielo para que se mantuvieran a la temperatura adecuada, lo más próximas posible entre ellas. Esto es debido a que la temperatura puede afectar a los valores de lectura. Se tuvieron todas las bandejas con las muestras preparadas previamente para poder procesarlas más rápido.

Para llevar a cabo este ensayo se realizaron 4 medidas a cada una de las muestras de carne, de tal manera que en total se obtuvieron 464 espectros. Para la determinación de cada medida tan solo era necesario colocar el área de muestreo en contacto con la ventana del analizador.

4.4 EXPERIMENTO 1 (Objetivo 1)

En este experimento se llevó a cabo un análisis visual de los espectros pertenecientes a las diferentes muestras de carne empleadas en este trabajo (cordero y ternera), en el cuál se analizaron los diferentes picos de absorción a lo largo del espectro, basándose en la bibliografía existente.

Tal y como se ha mencionado, las muestras de carne de cordero y de ternera se encuentran separadas por lotes de alimentación. Sin embargo, es importante destacar que, para la realización de este experimento, las muestras se agruparon por especie para la obtención del espectro característico.

4.4.1 Análisis

Se representaron los espectros de reflectancia medios para cada especie donde se identificaron los diferentes picos de absorción con los grupos funcionales, basándose en la bibliografía existente.

4.5 EXPERIMENTO 2 (Objetivo 2)

En este experimento se pretende probar la capacidad de la tecnología NIRS para clasificar muestras de cordero y ternera sometidos a diferentes raciones alimenticias.

Para ello se utilizaron los datos del experimento 1 agrupando cada especie (cordero y ternera) por tipo de alimentación.

4.5.1 Tratamiento de datos

El procesado de los datos espectrales se llevó a cabo con el software PLS Toolbox 731 trabajando bajo MATLAB® versión 8.3 (R2014a).

MATLAB® es un lenguaje de alto nivel y un entorno interactivo para el cálculo numérico, la visualización y la programación. Mediante MATLAB, es posible analizar datos, desarrollar algoritmos y crear modelos o aplicaciones. El lenguaje, las herramientas y las funciones matemáticas incorporadas permiten explorar diversos enfoques y llegar a una solución antes que con hojas de cálculo o lenguajes de programación tradicionales, como pueden ser C/C++ o Java™.

PLS Toolbox es el Software más extenso a nivel mundial de herramientas para el análisis multivariante quimiométrico, esencial y avanzado, para uso en el entorno computacional MATLAB.

PLS_Toolbox proporciona una interfaz gráfica unificada y más de 300 herramientas para su uso en una amplia variedad de áreas técnicas. Toma su nombre del método de regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS), que se ha convertido en el método de calibración estándar en muchas aplicaciones de regresión, pero ofrece mucho más. Contiene todas las herramientas de software de ingenieros químicos, analistas químicos y otros científicos de análisis impulsado por requerir para utilizar completamente sus datos y construir modelos predictivos.

En el presente trabajo, se llevaron a cabo diferentes análisis. En primer lugar, se realizaron dos análisis de componentes principales (ACP): uno para la carne de cordero por grupos de alimentación y otro para la carne de ternera por grupos de alimentación. En cada ACP se realizaron cinco pretratamientos de los datos (1ª derivada con cinco componentes principales (5CP), Multiplicative Scatter Correction (MSC), Detrending (DT), MSC + DT, 1ª derivada con 3CP + MSC). En segundo lugar, se llevó a cabo un análisis discriminante por mínimos cuadrados parciales (PLS-DA), el cuál se realizó aplicando el pretratamiento que mejores resultados proporcionó en el ACP.

4.5.1.1 Análisis de componentes principales (ACP)

Muchas de las herramientas quimiométricas, tanto de clasificación de muestras como de métodos de calibración, se basan en un análisis previo en componentes principales (PCA;

Principal Component Analysis), que pone de manifiesto las relaciones existentes entre las diferentes muestras y reduce la dimensionalidad de los datos experimentales (Jackson, 1991).

El Análisis de Componentes Principales es un método no supervisado definido por Martens (Martens & Martens, 2001) como ‘la madre de todos los análisis multivariantes’. Se trata de desarrollar un modelo bilineal en el que las variables originales (valores de absorbancia NIR) se combinan para formar otras, denominadas Componentes Principales (CP). Las relaciones de las CP con las muestras (filas de datos) se denominan *scores* (puntuaciones), y con las variables (columnas de datos), *loadings* (coeficientes de las variables).

Mediante el ACP es posible realizar una exploración de los datos para la detección de anómalos (outliers), agrupamiento de objetos y observación de gradientes entre grupos (Geladi, 2003).

Por lo tanto, la idea es aproximar la matriz original de datos a un producto de dos matrices de menor dimensión, definidas por los *scores* y los *loadings*, como se muestra en la siguiente expresión:

$$[X]_{n \times p} = [X]_{n \times d} \cdot [X]_{d \times p} + E$$

Donde:

$[X]_{n \times p}$: Matriz de datos originales con n objetos (muestras) y p variables (valores de absorbancia).

$[X]_{n \times d}$: Matriz relación n objetos (muestras) y d variables (CP) (define los *scores*).

$[X]_{d \times p}$: Matriz relación d CP con p valores de absorbancia (define los *loadings*).

E: Matriz residual, con la misma dimensión que la matriz de datos originales (n x p).

Las nuevas variables obtenidas (CP) son ortogonales y linealmente independientes.

El objetivo es explicar la mayor variabilidad posible de la matriz original (X), con el menor número de CP. (Geladi, 2003).

En el ACP una etapa crucial es seleccionar el número óptimo de CP. Este número realiza una separación entre las componentes que generan ruido y la información espectroscópica. Para decidir el número de CP existen diversos criterios estadísticos y heurísticos (Otto, 1999), como porcentaje de varianza explicada (si se posee la suficiente experiencia con los datos que

se manejan, se fija un porcentaje de varianza explicada, que es determinado por el número de CP a seleccionar), criterio de valor propio uno (se seleccionan las componentes principales que en las que su valor propio sea superior a uno; el valor propio medio de datos estandarizados es uno), prueba de sedimentación (*scree-set* ; la varianza residual se nivela cuando se obtiene el número adecuado de CP), validación cruzada (se eliminan uno/s objetos, se desarrolla el modelo definido por el ACP, los datos eliminados se predicen, calculando la suma de cuadrados de los residuales, seleccionando el número de CP que minimiza el error residual).

En este trabajo, el número óptimo de CP se seleccionó centrándose en la minimización del error residual.

Pretratamientos

En la espectroscopia NIR actual se analizan matrices muy complejas, que producen frecuentes fuentes de variación espectral (Heise *et al*, 2002):

- Interacciones entre compuestos químicos.
- Luz dispersa (Scattering) de partículas sólidas o líquidos con materiales en suspensión.
- Escasa reproducibilidad en el proceso de medida (variaciones en el paso óptico).
- Distorsiones espectrales debidas a instrumentación: variaciones de la línea base, modificaciones en las lecturas a determinadas longitudes de onda, no linealidad de los detectores, ruido instrumental.
- Bandas espectrales que provienen de sobretonos y combinaciones que producen solapamientos en el espectro.

Por lo tanto, extraer información relevante a partir de espectros NIR de productos agroalimentarios es complicado debido a la existencia de numerosas fuentes de error. Todas las fuentes de error se pueden concentrar en tres grupos: las relacionadas con factores instrumentales, ambientales y con la muestra.

Por este motivo, para minimizar los efectos mencionados, se efectúan pretratamientos sobre la señal como paso previo al desarrollo de modelos cuantitativos o cualitativos.

Los pretratamientos más comunes que se emplean para el desarrollo de aplicaciones NIRS, se suelen dividir en cuatro categorías: reducción de ruido, corrección de la línea base, mejora de resolución espectral y métodos de centrado y normalización espectral.

Derivadas

Son realmente diferencias finitas, puesto que la aplicación de derivadas verdaderas no es posible, dado que los espectros son digitalmente almacenados como una secuencia de puntos de datos y no como una función continua (condición de derivabilidad) (Heise *et al.*, 2002). Usualmente en datos NIRS se emplea la segunda derivada, que permite diferenciar picos solapados y reducir diferencias de tipo lineal. La primera derivada también tiene estos efectos, pero en menor grado (Hruschka *et al.*, 1987).

Multiplicative Scatter Correction (MSC)

Corrige tanto el efecto aditivo como el multiplicativo. La base de esta metodología radica en que la luz procedente de la radiación dispersa posee una dependencia de la longitud de onda diferente de la luz que se absorbe debido a compuestos químicos (Geladi *et al.*, 1985). De este modo, se pueden emplear datos de longitudes de onda para distinguir entre absorción de luz y radiación dispersa. Se calcula empleando todo el colectivo experimental.

Standard Normal Variate (SNV)

Se calcula de manera individual para cada espectro, por lo que no es dependiente del colectivo inicial usado en el cálculo. El resultado obtenido es un espectro transformado con media cero y desviación típica uno, corrigiendo desplazamientos espectrales a lo largo del eje vertical (Fernández Cabanas, 2003).

Detrending (DT)

Se emplea como complemento del tratamiento SNV, puesto que este no corrige curvaturas en la línea base. Al igual que la corrección SNV, se calcula de manera individual para cada espectro. Elimina la curvatura de la línea base causada por interacciones variables entre la humedad y efectos de partícula (Fernández Cabanas, 2003).

En cada ACP se realizaron cinco pretratamientos, con el fin de intentar reducir ruido, corregir de la línea base y mejorar la resolución espectral. Los pretratamientos aplicados fueron:

- Primera Derivada (1D)
- Primera Derivada y Multiplicative Scatter Correction (1D+MSC)
- Multiplicative Scatter Correction (MSC)
- Detrending (DT)
- Multiplicative Scatter Correction y Detrending (MSC+DT)

Además, unido a cada uno de los pretratamientos, se aplicó un pretratamiento adicional, Mean Center, que es uno de los métodos más comunes de preprocesado. Mean center calcula la media de cada columna de datos y resta este valor a la columna. Tiene el efecto de incluir una intercepción ajustable en modelos multivariantes.

Tal y como se ha comentado anteriormente, en este trabajo se llevaron a cabo dos ACP, uno para cada grupo de muestras (cordero y ternera).

4.5.1.2 Análisis discriminante por Mínimos Cuadrados Parciales (PLS-DA)

El PLS-DA es una técnica de clasificación lineal supervisada, que se basa en el algoritmo de regresión PLS (Ballabio y Consonni, 2013). PLS es un método de regresión lineal que encuentra la relación entre las variables predictivas (X) y la variable dependiente (Y). Trata de explicar la varianza del conjunto de datos, al mismo tiempo que correlaciona los datos con la respuesta.

Esta técnica, descrita por Stone (1974), consiste en una validación basada únicamente en los datos empleados en la etapa de calibración. Para ello, se eliminan de forma sucesiva muestras del colectivo de calibración que son empleadas para validar la ecuación desarrollada a partir del resto de muestras del colectivo de calibración que no han sido eliminadas. El procedimiento se repite hasta lograr que todas las muestras hayan sido utilizadas una vez para realizar la validación. Con ello se logra obtener una estimación de la capacidad de predicción de una ecuación más real que la obtenida durante el desarrollo del modelo de calibración. Desde el punto de vista estadístico, la etapa de validación consiste en la comparación, mediante diferentes criterios estadísticos, del valor verdadero y el valor estimado (Massart *et al.*, 1988). En este trabajo se ha utilizado el método de las cortinas venecianas (venetian blinds) con grupos de 10 muestras (splits).

En el PLS-DA, las principales fuentes de variabilidad en los datos se representan mediante latentes variables (LVs), que son, al igual que en el ACP, combinaciones lineales de las variables originales. Cuando se trabaja con PLS-DA, la variable dependiente (Y) debe transformarse en una matriz simulada en código binario con el mismo número de filas que X y el mismo número de columnas que los grupos cubiertos por X. Por lo tanto, la primera columna de Y será un vector con todos los valores iguales a cero excepto para aquellos componentes que corresponden a las muestras que pertenecen a la primera categoría, que serán iguales a 1 (Vitale *et al.*, 2013).

Para este trabajo se realizaron dos PLS-DA. Los grupos que se tuvieron en cuenta para realizar cada PLS-DA fueron cordero por grupos de alimentación y ternera por grupos de alimentación. Se introdujo una matriz respuesta (Y) para cada modelo PLS-DA desarrollado. Así, para los grupos de carne de cordero, la matriz tenía cuatro columnas, una por cada grupo de muestras. La primera con un vector dependiente [1 0 0 0] (correspondiente al grupo control), la segunda [0 1 0 0] (Lino), la tercera [0 0 1 0] (Lino + Algas) y la cuarta [0 0 0 1] (Chia). En el caso de la carne de ternera, la matriz respuesta (Y) tenía tres columnas, la primera con un vector dependiente [1 0 0] (para el grupo de muestras control), la segunda con el vector [0 1 0] (Lino), y la tercera con un vector [0 0 1] (lino + Vitamina E).

La precisión de cada modelo de PLS-DA se verifica, entre otros parámetros, por el porcentaje de muestras clasificadas correctamente, un factor relacionado con la sensibilidad y especificidad de las categorías dentro del modelo. La sensibilidad (sensitivity) de una clase (A), se describe como una proporción de muestras que pertenecen a esa clase (A) clasificadas correctamente (true positives, TP). Del mismo modo, la proporción de muestras que pertenecen a la clase A, clasificadas como de clase B, se nombran (false positives, FP) Sin embargo, la especificidad (specificity) de la misma clase A corresponde a la proporción de muestras que pertenecen a otra clase B que se clasifican como de clase B (true negatives, TN) y, finalmente, los falsos negativos (false, negatives, FN) son aquellas muestras que pertenecen a la clase B y se han clasificado como clase A.

Estos parámetros se pueden escribir de la siguiente manera (Parikh *et al.*, 2008):

$$Sensitivity = \frac{TP}{TP + FN}$$

$$Specificity = \frac{TN}{FP + TN}$$

Los valores de los parámetros sensibilidad y especificidad siempre están entre cero y uno. El resultado ideal en ambos casos es uno, ya que indica una clara diferenciación entre las muestras sometidas a estudio.

En este estudio, para el modelo de PLS-DA, las muestras se dividieron al azar en conjuntos de calibración y de validación que corresponden a 80% y 20% de las muestras respectivamente. El conjunto de datos de calibración se utilizó únicamente para construir el modelo de clasificación, mientras que el conjunto de datos de validación se utilizó para probar su capacidad de clasificar nuevas muestras. La precisión global del modelo de clasificación en los conjuntos de calibración, validación cruzada y validación se determina por el porcentaje

de las muestras clasificadas correctamente, la sensibilidad (sensitivity) y especificidad (specificity) de cada clase.

En el PLS-DA que se realizó en este trabajo se utilizaron dos pretratamientos, aplicados simultáneamente, teniendo en cuenta los resultados obtenidos con el PCA. Debido a que con los pretratamientos que se obtuvo una diferenciación relativamente clara entre los grupos de carne sometidos a diferentes tipos de alimentación fueron Multiplicative Scatter Correction (MSC) + Detrending (DT), estos fueron los pretratamientos elegidos para el PLS-DA.

4.6 EXPERIMENTO 3 (Objetivo 3)

Autenticación de muestras adulteradas de carne de ternera y cordero.

Dado que hay un espectro característico para cada especie (ternera y cordero), se pretende realizar una autenticación de las muestras, adulterándolas con diferentes porcentajes de otras carnes (cerdo, pollo, potro y toro de lidia).

4.6.1 Diseño del experimento y material

La preparación de las muestras y la medida de los espectros se llevó a cabo en los laboratorios de la Universidad Pública de Navarra.

El orden establecido para la realización del experimento fue el siguiente:

- Elección del material para el estudio (se encontraba previamente congelado).
- Descongelado en cámara frigorífica a 4°C, durante 24 horas.
- Preparación de las muestras picadas o hamburguesas.
- Medida de los espectros de reflectancia NIR.

Para la preparación de todas las hamburguesas se siguió la siguiente metodología:

- Se descongelaron las muestras de carne de cordero, ternera, cerdo, pollo, toro de lidia y potro el día anterior a la preparación de las hamburguesas, en una cámara frigorífica a 4°C, durante 24 horas.
- Una vez descongeladas se procedió al picado individual de la carne de cada especie, con una picadora de carne marca Moulinex de 500W de potencia, hasta que la carne adquirió un picado total. Se consideró un picado total cuando, al formar las muestras, la carne se unía de manera homogénea y no existían huecos u orificios en la hamburguesa.

- Obtenida la carne picada, se procedió a la realización de las hamburguesas. Cada hamburguesa control pesaba 3 ó 4 gramos en función de la cantidad de carne de ternera o cordero disponible para la realización de ese lote de 50 hamburguesas (figura 4.2). La carne se pesó en una balanza de precisión y se formaron las muestras a mano, de tal manera que cada muestra tenía un diámetro aproximado de 2 cm y 0,5 cm de grosor.

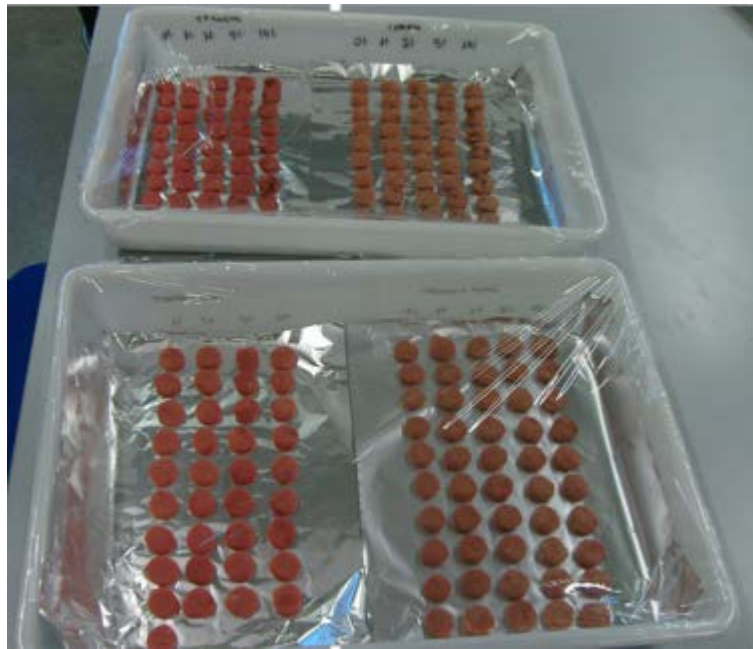


Figura 4.2. Hamburguesas empleadas en el estudio de la adulteración separadas por lotes de cincuenta muestras.

Las hamburguesas pesaban siempre lo mismo, por lo que, al realizar las muestras de ternera con cerdo al 1%, se pesaban 3,96 gramos de carne de ternera y se añadían 0,04 gramos a carne de cerdo. En el caso de las hamburguesas adulteradas al 2%, la cantidad de carne de ternera era de 3,92 gramos y 0,08 gramos de carne de cerdo. Para las muestras adulteradas al 5% se pesaron cantidades de ternera de 3,80 gramos y se añadieron 0,20 gramos de carne de cerdo. Por último, en las muestras adulteradas al 10% se pesaron 3,60 gramos de carne de ternera y 0,40 gramos de carne de cerdo.

Se repitió este procedimiento para las mezclas con carnes de pollo, toro de lidia y potro. También se repitió el procedimiento con la carne de cordero, a la que se fue añadiendo los diferentes porcentajes de adulteración. Tal y como se ha mencionado anteriormente, si se disponía de una cantidad suficiente de carne de ternera o cordero, se elaboraban hamburguesas de 3 gramos de peso. En este caso los pesos eran 3 gramos para las muestras control; 2,97 gramos de ternera o cordero y 0,03 gramos de cerdo, pollo, toro o potro en las hamburguesas adulteradas al 1%; 2,94 gramos y 0,06

gramos en las adulteradas al 2%; 2,85 gramos y 0,15 gramos en las muestras adulteradas al 5%; y, 2,70 gramos y 0,30 en las adulteradas al 10%.

- Una vez formadas las hamburguesas, se iban poniendo en una bandeja y se identificaban.
- Después de ponerlas en la bandeja, se taparon con papel film y se metieron en la cámara de refrigeración a 4°C para su posterior análisis 24 horas después.

En las tablas 4.3 y 4.4 se resume la metodología empleada en la preparación de las muestras.

Tabla 4.3. Resumen preparación de las muestras de carne de cordero

CORDERO (n _c =200)	CERDO (n _{cc} = 50)	Control (n _{ccc} = 10)
		1% (n _{cc1%} = 10)
		2% (n _{cc2%} = 10)
		5% (n _{cc5%} = 10)
	POLLO (n _{cp} = 50)	10% (n _{cc10%} = 10)
		Control (n _{cpc} = 10)
		1% (n _{cp1%} = 10)
		2% (n _{cp2%} = 10)
	TORO (n _{ct} = 50)	5% (n _{cp5%} = 10)
		10% (n _{cp10%} = 10)
		Control (n _{ctc} = 10)
		1% (n _{ct1%} = 10)
	POTRO (n _{cpt} = 50)	2% (n _{ct2%} = 10)
		5% (n _{ct5%} = 10)
		10% (n _{ct10%} = 10)
		Control (n _{cptc} = 10)
POTRO (n _{cpt} = 50)	1% (n _{cpt1%} = 10)	
	2% (n _{cpt2%} = 10)	
	5% (n _{cpt5%} = 10)	
	10% (n _{cpt10%} = 10)	

Tabla 4.4. Resumen preparación de las muestras de carne de ternera

TERNERA ($n_T=186$)	CERDO ($n_{Tc} = 50$)	Control ($n_{Tcc} = 10$)
		1% ($n_{Tc1\%} = 10$)
		2% ($n_{Tc2\%} = 10$)
		5% ($n_{Tc5\%} = 10$)
		10% ($n_{Tc10\%} = 10$)
	POLLO ($n_{Tp} = 50$)	Control ($n_{Tpc} = 10$)
		1% ($n_{Tp1\%} = 10$)
		2% ($n_{Tp2\%} = 10$)
		5% ($n_{Tp5\%} = 10$)
		10% ($n_{Tp10\%} = 10$)
	TORO ($n_{Tt} = 50$)	Control ($n_{Ttc} = 10$)
		1% ($n_{Tt1\%} = 10$)
		2% ($n_{Tt2\%} = 10$)
		5% ($n_{Tt5\%} = 10$)
		10% ($n_{Tt10\%} = 10$)
	POTRO ($n_{Tpt} = 36$)	Control ($n_{Tptc} = 0$)
		1% ($n_{Tpt1\%} = 9$)
		2% ($n_{Tpt2\%} = 9$)
		5% ($n_{Tpt5\%} = 9$)
10% ($n_{Tpt10\%} = 9$)		

4.6.2 Espectrofotómetro

Para la realización del ensayo se utilizó un espectrofotómetro modelo AOTF-NIR Luminar 5030 de la empresa Brimrose (el mismo equipo empleado en los experimento 1 y 2).

Antes de medir, se realizó la calibración del espectrofotómetro con una muestra, de forma que la ganancia energética del amplificador se encontrara entre los valores 33.000 y 66.000. En este caso, fue necesario calibrar el equipo con una ganancia x2.

Se tomaron 5 medidas espectrales de cada muestra (figura 4.3). Así, de cada grupo de muestras (50 hamburguesas de cordero o ternera adulteradas con cerdo, pollo, toro o potro) se obtuvieron un total de 250 espectros medios. Cerca de 1000 espectros con los que más adelante se procedió al análisis estadístico. Para la realización de las medidas, simplemente se colocaban las muestras en una placa de cristal, se ponía debajo un cuerpo negro y se ponían en contacto el área de muestreo con la ventana del analizador (figura 4.4).

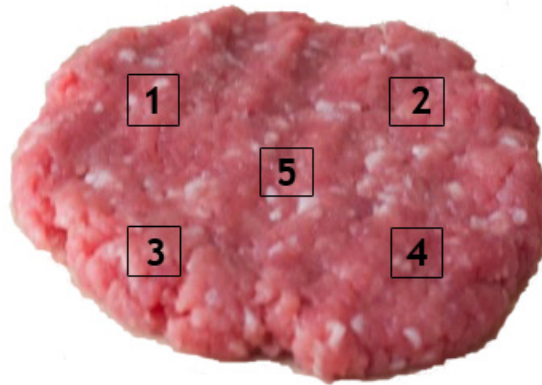


Figura 4.3. Zonas de medida en cada hamburguesa.

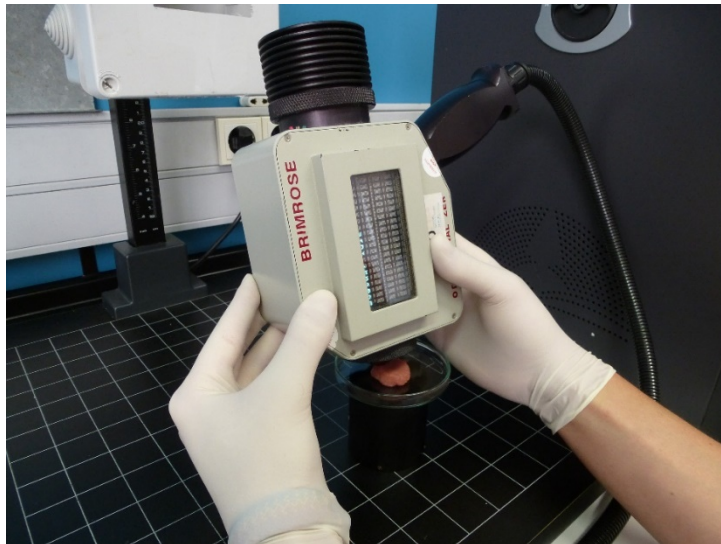


Figura 4.4 Proceso de medida de los espectros de reflectancia.

4.6.3 Análisis estadístico

En este experimento, de la misma manera que en caso anterior, se llevaron a cabo diferentes análisis. En primer lugar, se realizó un análisis de componentes principales (ACP) para cada grupo de muestras (por ejemplo: ternera adulterada con cerdo), y, en cada ACP se realizaron los mismos cinco pretratamientos que en el experimento anterior (1ª derivada con cinco componentes principales (5CP), MSC, DT, MSC + DT, 1ª derivada con 3CP + MSC).

Para este experimento se realizaron 8 PLS-DA en total. Los grupos que se tuvieron en cuenta para realizar cada PLS-DA fueron: muestras control, adulteradas al 5% y adulteradas al 10%. Asimismo, se realizaron PLS-DA con los cinco grupos de muestras analizadas (control y cuatro lotes de muestras adulteradas). Sin embargo, no se obtuvieron los resultados deseados, ya que como se había observado previamente en el ACP, existía mucha confusión entre los

lotes control y adulteradas al 1% y 2%. Se ha añadido un resultado en el presente trabajo como ejemplo.

Se introdujo una matriz respuesta (Y) para cada modelo PLS-DA desarrollado. Así, cada matriz tenía tres columnas, una por cada grupo de muestras. La primera con un vector dependiente [1 0 0] (correspondiente al grupo control), la segunda [0 1 0] (5%) y la tercera [0 0 1] (10%).

En este estudio, para el modelo de PLS-DA, las muestras se dividieron al azar en conjuntos de calibración y de validación que corresponden a 70% y 30% de las muestras respectivamente. Del mismo modo que en el caso anterior, el conjunto de datos de calibración se utilizó únicamente para construir el modelo de clasificación, mientras que el conjunto de datos de validación se utilizó para probar su capacidad de clasificar nuevas muestras. La precisión global del modelo de clasificación en los conjuntos de calibración, validación cruzada y validación se determinó por el porcentaje de las muestras clasificadas correctamente, la sensibilidad y especificidad de cada clase.

En el PLS-DA realizado en este trabajo, se utilizó un único pretratamiento, teniendo en cuenta los resultados obtenidos con el ACP. Debido a que en el único pretratamiento que se obtuvo una diferenciación clara entre el grupo de muestras no adulteradas y los grupos adulterados fue Detrending (DT), este fue el pretratamiento elegido para el PLS-DA.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 EXPERIMENTO 1

La media de los espectros de reflectancia NIR para los dos tipos de carne estudiados (cordero y ternera) en el rango espectral de 1100 nm a 2300 nm, se presentan en la figura 5.1. Para la obtención de estos espectros medios de reflectancia, se utilizaron, en el caso de la carne de cordero, 280 espectros medios y, en el caso de la carne de ternera, 184 espectros medios.

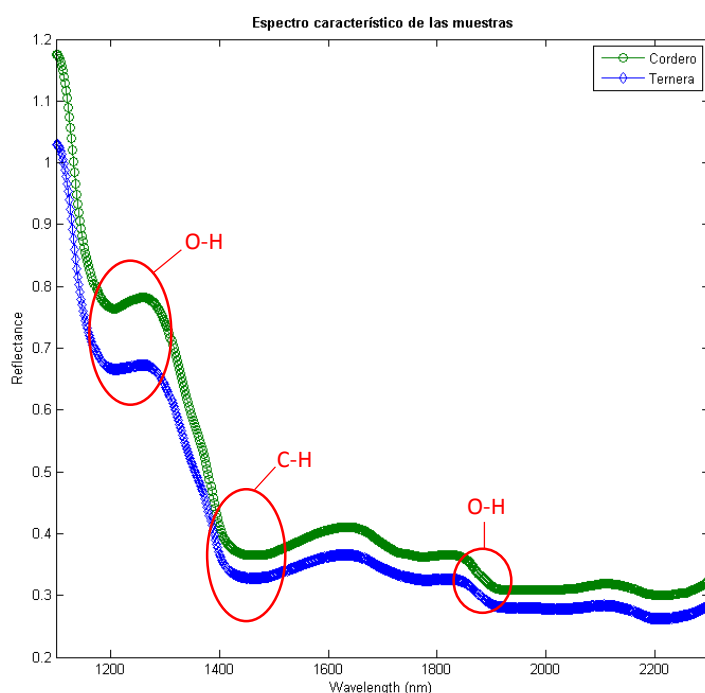


Figura 5.1. Espectros característicos de la carne de cordero y de la carne de ternera.

En general, los picos observados en la región NIR se deben a sobretonos o combinaciones de vibraciones fundamentales de los grupos funcionales C-H, N-H, O-H y S-H. En la región de 1200 nm, se observa un valle que corresponde al pico de absorción de grasa relacionada con el segundo sobretono de los enlaces C-H (Cozzolino y Murray, 2004; Andrés *et al.*, 2008). Asimismo, en la región del 1450 nm se observa el mayor valle correspondiente al pico de absorción de agua, relacionada con los sobretonos de los enlaces O-H, así como en la región del 1900 nm en la que aparece otro valle referido a un pico de absorción de agua (Osborne *et al.*, 1993).

La figura 5.2 muestra la segunda derivada de los espectros medios de reflectancia de ambas muestras donde los picos de reflectancia y absorbancia son más evidentes.

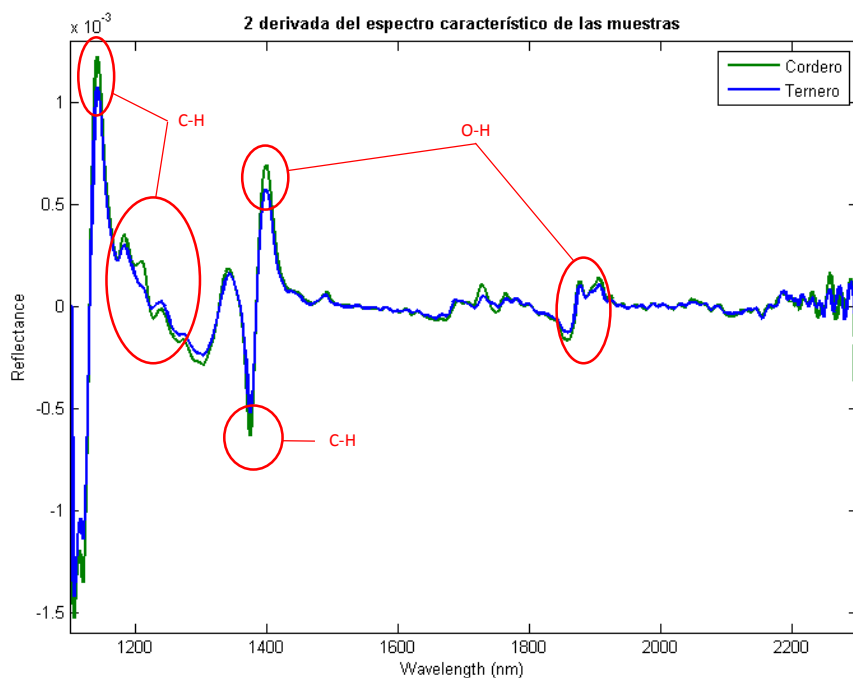


Figura 5.2. Segunda derivada de los espectros característicos de la carne de cordero y ternera.

En la figura 5.2 se observan más picos de reflectancia relacionados con bandas de absorción del grupo funcional C-H. En la región de 1100 nm se encuentra el pico de reflectancia más pronunciado, correspondiente al segundo sobretono de los enlaces C-H, relacionado, en concreto, con los grupos metilo (CH_3). Asimismo, en la región de 1200 nm a 1400 nm, se encuentran varios picos vinculados con los grupos CH y CH_2 . Todos estos enlaces guardan relación con el contenido en ácidos grasos de la carne (Osborne et al., 1993).

Comparando los espectros se observa que en general el de carne de cordero presenta picos de absorción más pronunciados que el de carne de ternera. Este resultado se puede explicar si se tiene en cuenta que la dieta suministrada a los corderos puede actuar para que el perfil aromático de ácidos grasos resulte más definido que el de la carne de ternera.

Por otro lado, se observan otras dos regiones del espectro con picos pronunciados y que se corresponden con bandas de absorción de los grupos O-H. Concretamente, en la región de 1450 nm y 1900 nm aparecen picos de absorción relacionados con el contenido de almidón y de agua de la carne (Osborne et al., 1993). En este caso, los picos de ambas especies casi no difieren, siendo un poco mayor el contenido de humedad de la carne de cordero. En cuanto al contenido de almidón, apenas se encuentran diferencias entre especies

Los espectros de reflectancia de los dos tipos de carne son, en general, muy similares, presentando únicamente diferencias en la magnitud de la reflectancia. Tal y como ocurre en

otros estudios (Kamruzzaman *et al.*, 2012), el espectro de reflectancia de carne de cordero presenta valores más altos que el espectro de reflectancia de carne de ternera. Estas diferencias espectrales entre ambas muestras, se deben a las distintas características fisicoquímicas de la carne como la capacidad de retención de agua, proteínas, humedad, grasa intramuscular, ácidos grasos y otras características como pueden ser la estructura del músculo y el tipo de fibras musculares (Kamruzzaman *et al.*, 2012).

5.2 EXPERIMENTO 2

En la figura 5.3 se presentan los espectros de reflectancia de carne de cordero y carne de ternera sometido a diferentes tipos de alimentación.

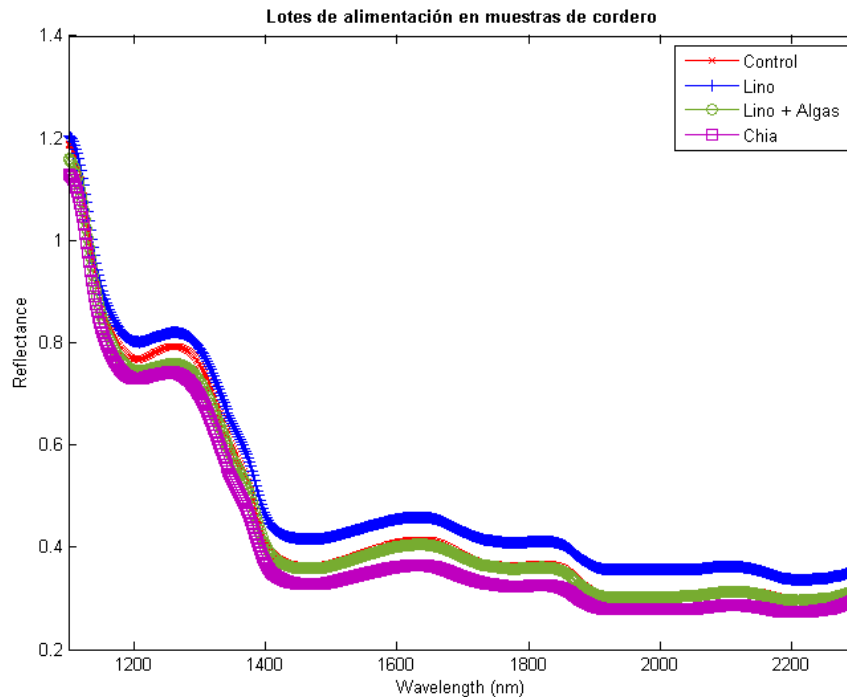


Figura 5.3. Espectros de reflectancia de carne de cordero por lotes de alimentación

En la figura 5.3, se puede observar que los espectros de reflectancia de carne de cordero sometidos a diferentes tipos de alimentación siguen un comportamiento similar a lo largo de la región NIR, diferenciándose únicamente en las magnitudes de reflectancia que presentan en algunos casos. Así, se observa como el espectro de los corderos control (alimentados con cebada) se solapa con el espectro de los corderos alimentados con lino + algas. El espectro que presenta valores de reflectancia más altos y, por lo tanto valores de absorción más bajos, es el de corderos alimentados con lino. Por otro lado, el espectro de corderos alimentados con chia es el que presenta valores de absorción más altos. En general, los espectros presentan los mismos picos de absorción destacados en el experimento 1.

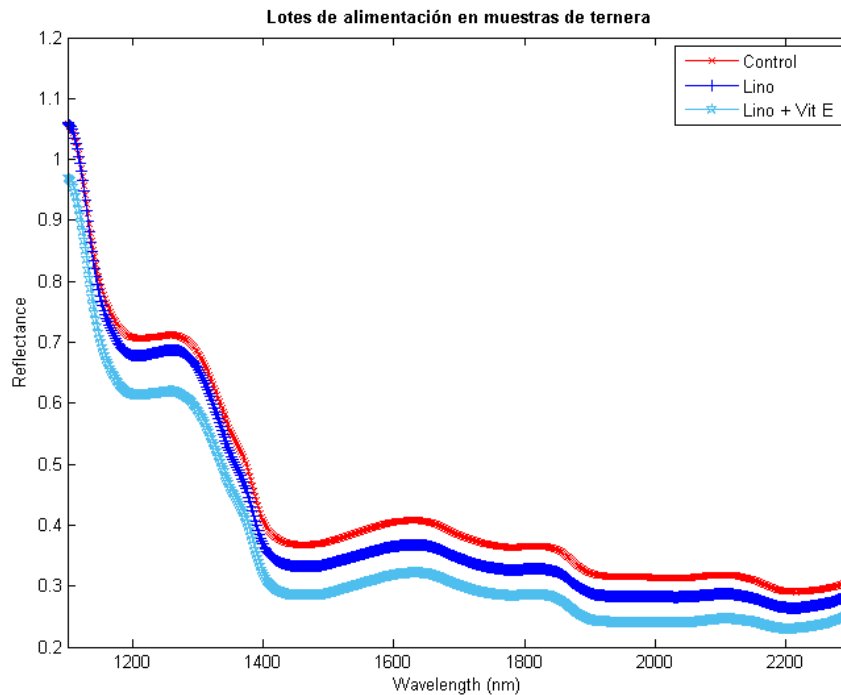


Figura 5.4. Espectros de reflectancia de carne de ternera por lotes de alimentación

Tal y como se puede observar en la figura 5.4, los espectros de reflectancia de terneros sometidos a diferentes tipos de alimentación difieren únicamente en la magnitud de reflectancia. Los terneros del grupo control (alimentados con cebada) presentan los valores más altos; mientras que los terneros del grupo de alimentación lino + vitamina E, los más bajos.

5.2.1 ACP

Se realizaron los ACP para cada grupo de muestras de carne de cordero y de ternera procedente de los lotes de animales sometidos a cada tipo de alimentación.

El software empleado para este análisis fue PLS Toolbox versión 731, un software específico para el tratamiento quimiométrico de datos que trabaja bajo el entorno Matlab. MATLAB® versión 8.3 (R2014a) también se empleó para este análisis. Se realizó una exploración visual de los resultados obtenidos con el fin de identificar los diferentes lotes empleados en el análisis.

Durante el desarrollo de una ecuación de calibración NIR, siempre se observa la presencia de determinadas muestras que, por diversos motivos, presentan un comportamiento diferente al resto de muestras presentes en el colectivo de calibración. A estas muestras se les denomina

outliers. La presencia de estos *outliers* puede ser causada tanto por la información espectroscópica como por la química. Es importante destacar que, tanto en el ACP como el en PLS-DA se detectaron y se eliminaron algunos *outliers*.

A continuación se presenta la tabla 5.1, que resume los resultados obtenidos con los ACPs con cada pretratamiento y cada grupo de muestras de carne de cordero y carne de ternera.

Tabla 5.1. Capacidad de diferenciación de grupos de alimentación en carne de cordero y de ternera

Pretratamiento	CORDERO	TERNERA
1D	X	X
1D+MSC	X	X
MSC	X	X
DT	✓ - X	X
MSC+DT	✓ - X	✓ - X

Cc: cordero-cerdo; Cp; cordero-pollo; Ct: cordero-toro de lidia; Cpt: cordero-potro.

“X”: El pretratamiento no diferencia entre grupos; “✓”: El pretratamiento si diferencia entre grupos; “✓ - X”: El pretratamiento sólo diferencia entre algún grupo de los presentes pero no entre todos ellos.

En la tabla 5.1 se puede observar que, tras realizar el ACP, los grupos de carne de cordero y de ternera sometidos a diferentes tipos de alimentación no se diferencian completamente con los cinco pretratamientos realizados. Los pretratamientos con los que mejor se consigue una separación entre los grupos de alimentación fueron, DT y MSC + DT para el caso de la carne de cordero, y, MSC + DT para la carne de ternera.

A continuación se presentan las figuras 5.5, 5.6 y 5.7, en las que se puede observar de manera visual esta separación entre grupos.

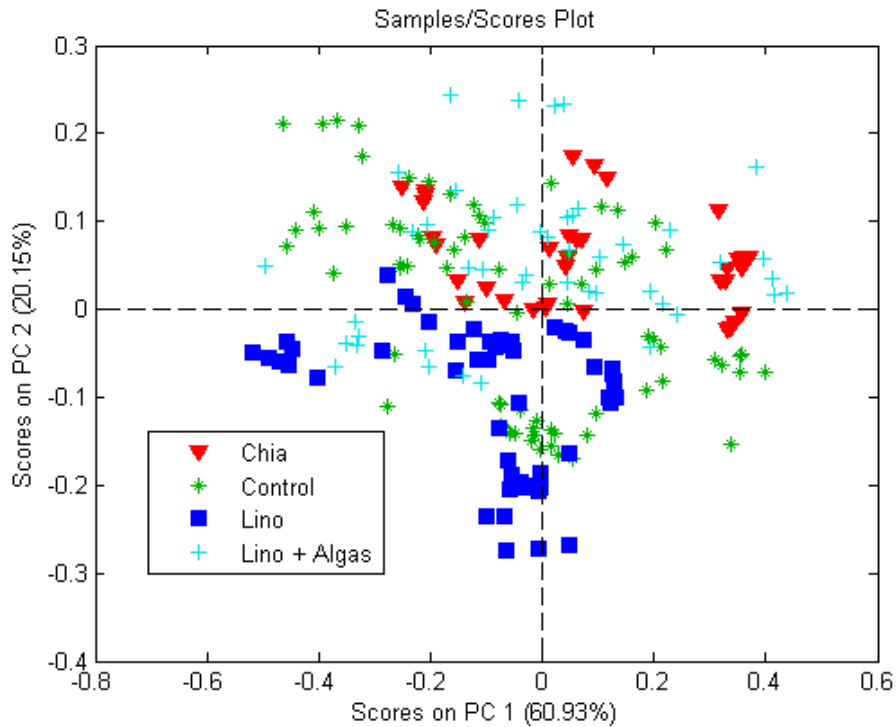


Figura 5.5. PCA Grupos de alimentación corderos aplicando el pretratamiento MSC con 8 PC.

Para el caso de la carne de corderos sometidos a cuatro tipos de alimentación, se observa cómo, aplicando el pretratamiento MSC y seleccionando ocho componentes principales, se produce una separación entre los grupos de muestras de carne de corderos alimentados con lino y corderos alimentados con chia. Sin embargo, los grupos control y lino + algas se encuentran más dispersos y no se logra una clara diferenciación de estos grupos. Esto indica la capacidad del modelo para poder diferenciar entre los grupos lino y chia, pero no queda clara la aptitud del mismo para diferenciar los otros grupos de alimentación.

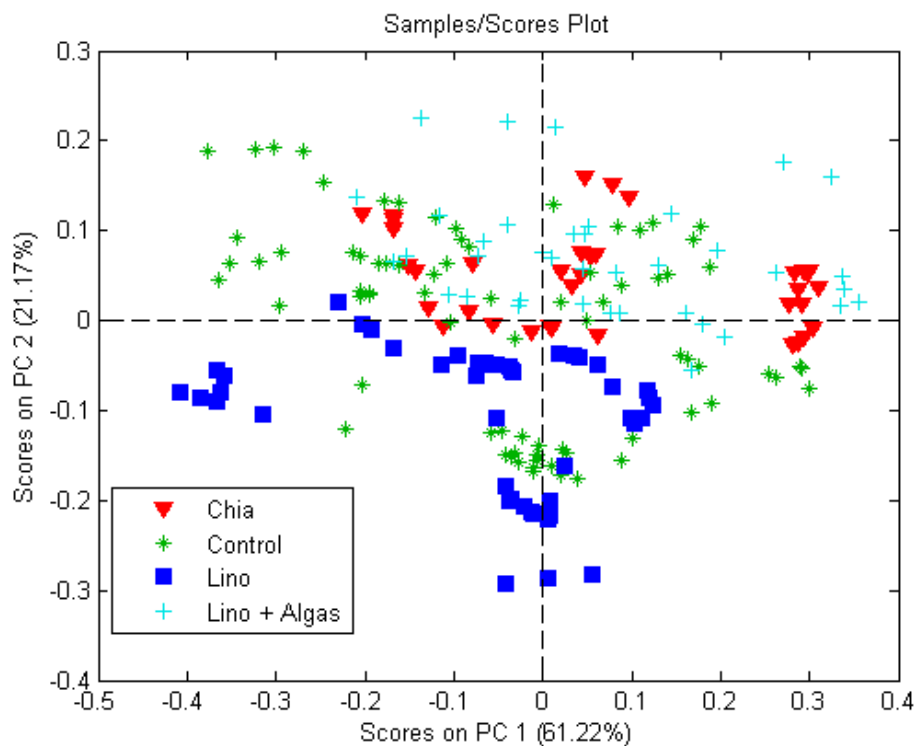


Figura 5.6. PCA Grupos de alimentación corderos aplicando el pretratamiento MSC + DT con 8 PC.

En el caso de la figura 5.6, aplicando el pretratamiento MSC + DT y seleccionando 8 PC, se observa la misma separación que en la figura 5.5. Además, se puede observar una tendencia en la separación de los grupos control y lino + algas del grupo de muestras lino.

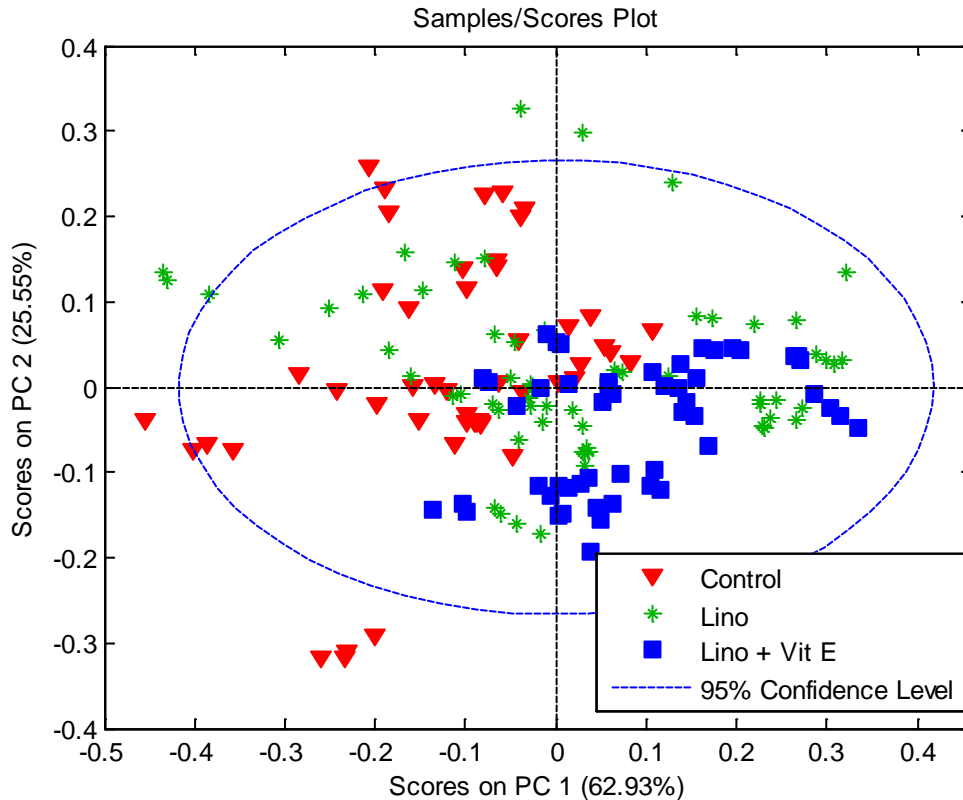


Figura 5.7. PCA Grupos de alimentación terneros aplicando el pretratamiento MSC + DT con 8 PC.

En el caso de la carne de ternera, se puede observar en la figura 5.7 que no existe una separación clara entre grupos. Sin embargo, hay una tendencia en la separación de los grupos control y lino + vitamina E. En este caso, los pretratamientos aplicados fueron MSC + DT con 8 PC. En los demás pretratamientos aplicados con los datos de carne de ternera no se obtuvieron los resultados esperados.

Con estos ACP realizados a las muestras de carne de cordero sometidos a cuatro tipos de alimentación y a la carne de terneros sometidos a tres tipos de alimentación, no queda clara la capacidad del modelo para diferenciar entre muestras, por lo tanto, se decidió complementar el análisis con un análisis discriminante por mínimos cuadrados parciales PLS-DA.

5.2.2 PLS-DA

Después de haber desarrollado una ecuación de calibración mediante el PLS-DA, se realizó la validación cruzada.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el ACP, se decidió realizar un PLS-DA con los pretratamientos MSC + DT. En las tablas 5.2 a 5.9 se pueden observar los resultados del análisis.

Tabla 5.2. Porcentaje de muestras de carne de cordero bien clasificadas por tipo de alimentación

%	Alimentación	Calibración (Cal)	Val. Cruzada (CV)	Val. Externa (Pred)
CORDERO	CONTROL	39,06	31,25	47,05
	LINO	57,14	51,78	47,05
	LINO + ALGAS	42,55	36,17	41,66
	CHIA	51,61	45,16	87,50

Tal y como se observa en la tabla 5.2, los porcentajes de muestras bien clasificadas son, en general, inferiores al 50%. Así, por ejemplo, en el caso del grupo de muestras control, el porcentaje apenas alcanza el 39%. Esto quiere decir que las muestras control se clasifican en la mayoría de los casos como muestras de otro grupo de alimentación. En el caso del ACP, los grupos de muestras mejor clasificados son lino y chia. En estos casos, el porcentaje de muestras bien clasificadas es superior al 50%, aunque no se puede decir que se trate de un buen resultado. Por lo tanto, se puede decir que el modelo presenta dificultades para clasificar de manera correcta las muestras de carne de cordero en función de la alimentación.

En la tabla 5.3 se presentan los valores de sensibilidad y especificidad de los diferentes grupos para los modelos de calibración (Cal), Validación cruzada (CV) y validación externa o predicción (Pred).

Tabla 5.3. Proporciones de sensibilidad y especificidad en carne de cordero por tipo de alimentación.

CORDERO	Alimentación	Sensibilidad			Especificidad		
		Cal	CV	Pred	Cal	CV	Pred
	CONTROL	0,766	0,703	0,824	0,381	0,396	0,405
	LINO	0,768	0,679	0,765	0,690	0,655	0,757
	LINO + ALGAS	0,660	0,511	0,667	0,728	0,702	0,810
	CHIA	0,742	0,645	0,875	0,731	0,743	0,652

En la tabla 5.3, se puede observar que los parámetros que presentan valores más bajos son los de las muestras lino + algas. Sin embargo, para los otros tres grupos de muestras adulteradas, se tienen proporciones por encima de 0,7. Para las muestras control y lino se tienen las proporciones más altas en el modelo de calibración. Sin embargo, se obtienen peores resultados en los modelos de validación cruzada y predicción, llegando a tener un valor de 0,4 para las muestras control. En general, se puede decir que los grupos que mejor se diferencian son los grupos control, lino y chia ya que son los grupos en los que se obtuvo una mayor sensibilidad y especificidad. Estos resultados indican la dificultad del modelo para diferenciar las muestras de cordero por tipo de alimentación, por ello, se realizó otro análisis discriminante PLS, seleccionando únicamente los grupos control y chia y de esta manera comprobar si era posible obtener una clasificación precisa entre ambos grupos.

A continuación se presentan los resultados obtenidos con el PLS-DA realizado para los grupos de corderos alimentados con control y chia (tablas 5.4 y 5.5).

Tabla 5.4. Porcentaje de muestras bien clasificadas de los grupos de alimentación control y chia de carne de cordero.

%	Alimentación	Calibración (Cal)	Val. Cruzada (CV)	Val. Externa (Pred)
CORDERO	CONTROL	82,81	78,13	57,14
	CHIA	81,25	81,25	71,43

Tabla 5.5. Proporciones de sensibilidad y especificidad obtenidas en el PLS-DA en dos grupos de alimentación en carne de cordero.

CORDERO	Alimentación	Sensibilidad			Especificidad		
		Cal	CV	Pred	Cal	CV	Pred
	CONTROL	0,828	0,781	0,571	0,813	0,813	0,714
	CHIA	0,813	0,813	0,714	0,828	0,781	0,571

Tal y como se puede observar en las tablas 5.4 y 5.5, separando el análisis para dos grupos de alimentación en carne de cordero, se obtuvieron mejores resultados tanto en el porcentaje de muestras bien clasificadas, como en las proporciones de sensibilidad y especificidad en los diferentes modelos de calibración y validación. Los porcentajes de muestras bien clasificadas superan en este caso el 80% y las proporciones de los modelos de calibración y validación se encuentran alrededor de 0,8.

Para las muestras de carne de terneros sometidos a diferentes raciones alimenticias, también se realizó un PLS-DA en el que se aplicaron de forma simultánea los pretratamientos MSC + DT. En las tablas 5.6 y 5.7, se presentan los resultados obtenidos en este análisis.

Tabla 5.6. Porcentaje de muestras de carne de ternera bien clasificadas por tipo de alimentación.

%	Alimentación	Calibración (Cal)	Val. Cruzada (CV)	Val. Externa (Pred)
TERNERA	CONTROL	63,63	60,61	72,72
	LINO	22,50	25,00	0,00
	LINO + VITAMINA E	50,98	47,06	45,45

En la tabla 5.6 se observa cómo para las muestras de terneros alimentados con lino se obtienen unos porcentajes muy bajos de muestras bien clasificadas, no superando en ninguno de los casos el 25%. Para las muestras de los grupos control y lino + vitamina E, se obtienen mejores resultados aunque también se consideran bajos los porcentajes obtenidos.

Tabla 5.7. Proporciones sensibilidad y especificidad para las muestras de carne de terneros sometidos a distintas raciones alimenticias.

	Alimentación	Sensibilidad			Especificidad		
		Cal	CV	Pred	Cal	CV	Pred
TERNERA	CONTROL	0,636	0,606	0,818	0,637	0,637	0,591
	LINO	0,375	0,350	0,273	0,750	0,726	0,818
	LINO + VITAMINA E	0,745	0,725	0,818	0,479	0,493	0,500

En la tabla 5.7 se observa que las muestras de carne de terneros sometidos a distintas raciones alimenticias presentan, en general, valores bajos de sensibilidad y especificidad, lo que indica que el modelo no consigue identificar de forma clara las muestras en función de la alimentación recibida. Por este motivo, y dado que son los grupos que mejor se clasifican, se decidió realizar otro análisis PLS-DA para los grupos control y lino + vitamina E.

Tabla 5.8. Porcentaje de muestras bien clasificadas de los grupos de alimentación control y lino + vitamina E de carne de ternera.

%	Alimentación	Calibración (Cal)	Val. Cruzada (CV)	Val. Externa (Pred)
TERNERA	CONTROL	86,67	75,56	72,72
	LINO + VITAMINA E	83,33	75,00	40,00

Tabla 5.9. Proporciones de sensibilidad y especificidad obtenidas en el PLS-DA en dos grupos de alimentación en carne de ternera.

TERNERA	Alimentación	Sensibilidad			Especificidad		
		Cal	CV	Pred	Cal	CV	Pred
	CONTROL	0,867	0,733	0,727	0,833	0,750	0,400
	LINO + VITAMINA E	0,833	0,750	0,400	0,867	0,733	0,727

En las tablas 5.8 y 5.9, se observa que al repetir el análisis PLS-DA teniendo en cuenta únicamente dos grupos de alimentación, los porcentajes de muestras bien clasificadas aumentan notablemente. En las muestras del grupo de calibración, los porcentajes de bien clasificadas supera en ambos casos el 83%, y en el grupo de validación cruzada el 75%. Esto indica que los grupos de alimentación control y lino + vitamina E se clasifican mejor que si se tiene en cuenta el grupo de alimentación lino.

Estos resultados obtenidos, tanto en carne de cordero como en carne de ternera sometidos a diferentes raciones alimenticias, se podrían mejorar si se aumenta el tamaño muestral y, por lo tanto, el número de medidas espectrales utilizadas en los análisis discriminantes realizados. No obstante, mediante este estudio puede afirmarse que la tecnología NIRS es capaz de clasificar entre muestras de cordero alimentados con cebada frente a muestras de corderos alimentados con chia con un alto porcentaje de fiabilidad. De la misma manera, se puede decir que se consigue una clasificación bastante precisa entre muestras de terneros alimentados con cebada frente a muestras en la que la ración fue lino + vitamina E.

En los últimos años, se han realizado estudios de clasificación de productos cárnicos mediante la tecnología NIRS en función del tipo de alimentación suministrada a los animales, obteniendo muy buenos resultados que pueden ser utilizados incluso a nivel comercial (Zamora-Rojas *et al.*, 2012). Otros estudios señalan la capacidad de la técnica NIR a la hora de predecir el perfil aromático de la carne y la posibilidad de clasificación por calidades (De Marchi *et al.*, 2012).

5.3 EXPERIMENTO 3

A continuación, se presentan los espectros de reflectancia que se obtuvieron en las muestras de carne de cordero y de ternera adulteradas con diferentes porcentajes de carne de cerdo, pollo, toro de lidia y potro.

En las figuras 5.8 a 5.11 se representan los 5 lotes de muestras de cordero adulteradas, es decir, el lote control y los 4 lotes de muestras adulteradas con diferentes porcentajes. Se puede apreciar cómo los espectros de reflectancia se solapan y siguen una tendencia similar en todos los casos. En este caso se observa cómo las muestras control presentan mayores picos de absorción en las zonas características de 1200 nm, 1450 nm y 1900 nm, salvo para el caso de las muestras adulteradas con carne de potro, ya que los valores de absorbancia de las muestras control son menores que en las muestras adulteradas.

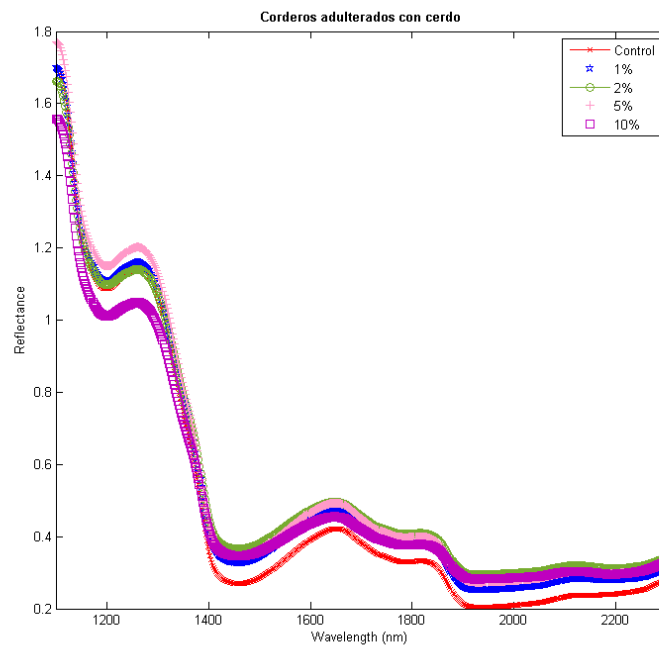


Figura 5.8. Espectros de reflectancia de las muestras de cordero adulteradas con carne de cerdo

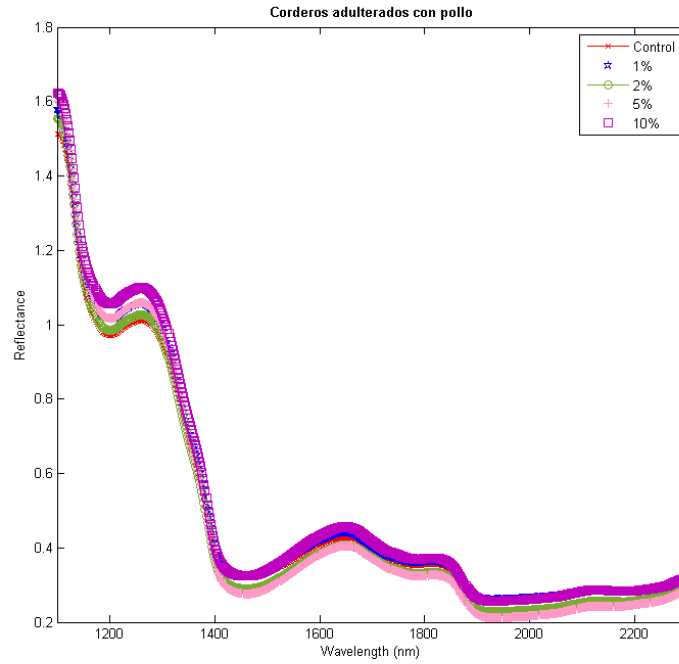


Figura 5.9. Espectros de reflectancia de las muestras de cordero adulteradas con carne de pollo

En la figura 5.10, correspondiente a las muestras de carne de cordero adulteradas con toro de lidia, se observa cómo los valores de absorbancia son mayores para las muestras control en la región de 1200 nm y van disminuyendo a medida aumenta el porcentaje de adulteración.

En este caso se observa cómo las muestras con un porcentaje de adulteración del 5% son las que mayores valores de absorbancia presentan de 1400 nm en adelante. Por el contrario, las muestras adulteradas al 10% son las que menores valores de absorbancia presentan a lo largo de todo el espectro. Este comportamiento no se puede extrapolar a los diferentes lotes, ya que cada uno se comporta de manera diferente.

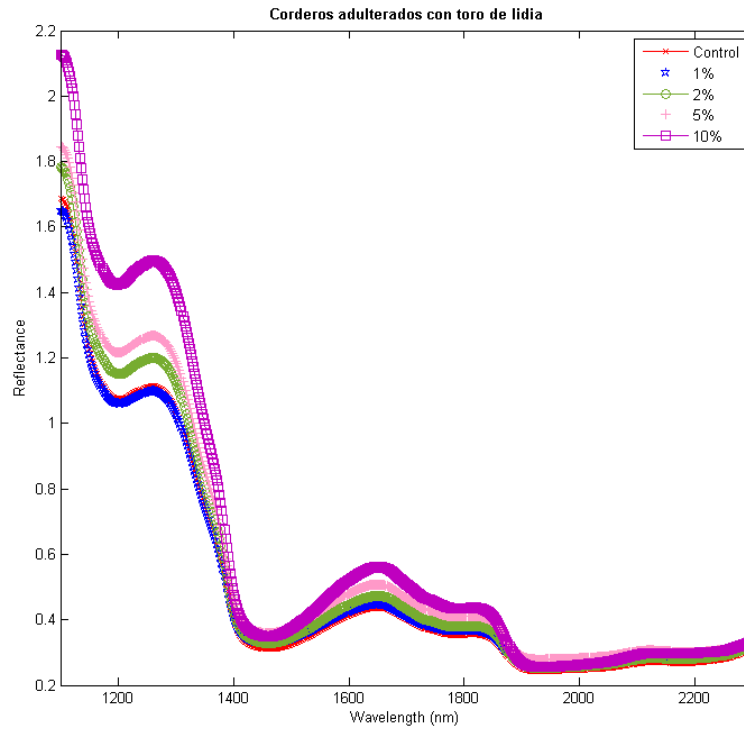


Figura 5.10. Espectros de reflectancia de muestras de cordero adulteradas con carne de toro de lidia

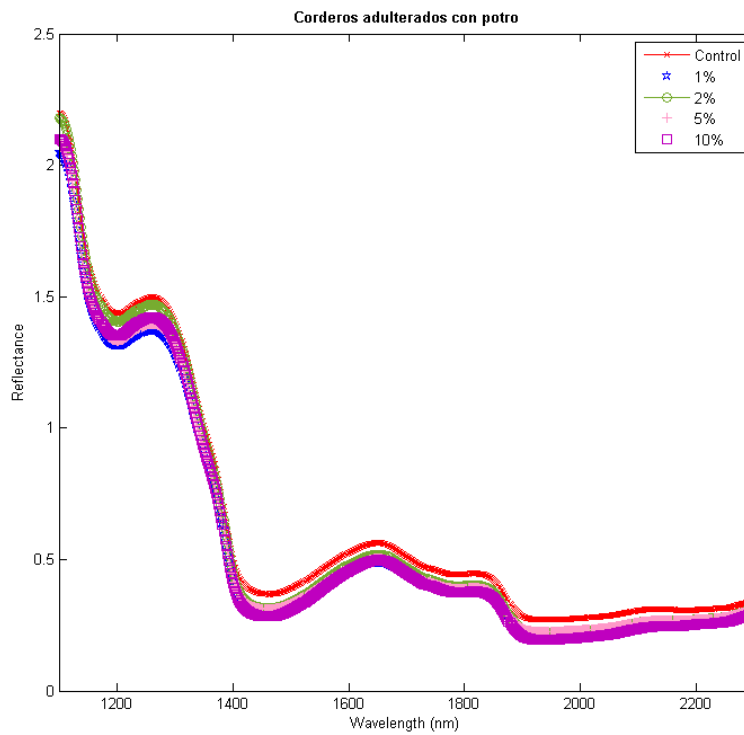


Figura 5.11. Espectros de reflectancia de muestras de carne de cordero adulteradas con carne de potro

Las figuras 5.11-5.14 representan las muestras de ternera adulteradas con los 4 tipos de carne previamente descritos. Tal y como se puede observar en las siguientes figuras (5.12-5.14), los espectros se solapan con mayor claridad y apenas se aprecian diferencias entre los distintos grupos de muestras. Del mismo modo que para las muestras de cordero, se puede decir que en algunos casos los valores de absorbancia en los picos característicos disminuyen al aumentar el porcentaje de adulteración.

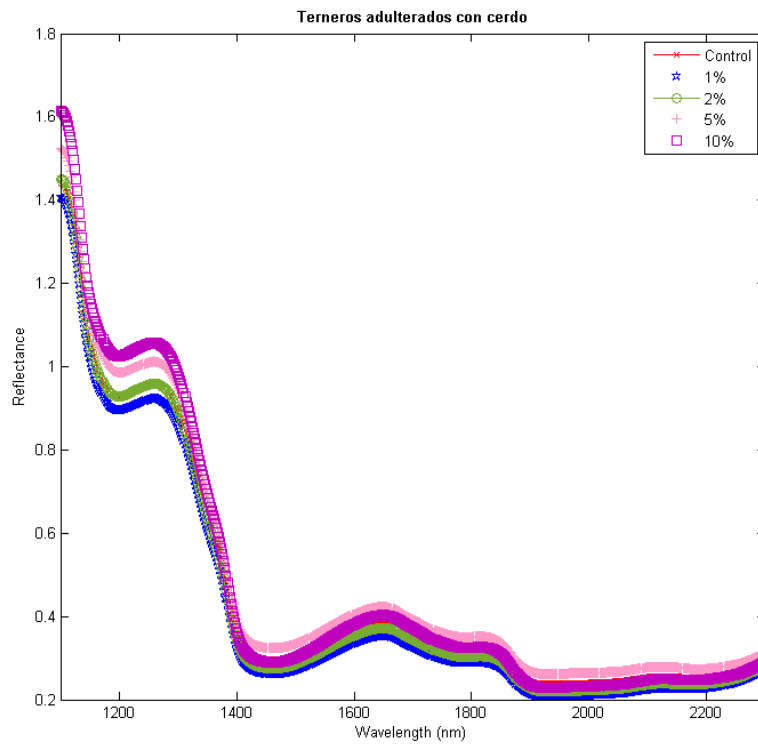


Figura 5.12. Espectros de reflectancia de muestras de carne de ternera adulterada con carne de cerdo

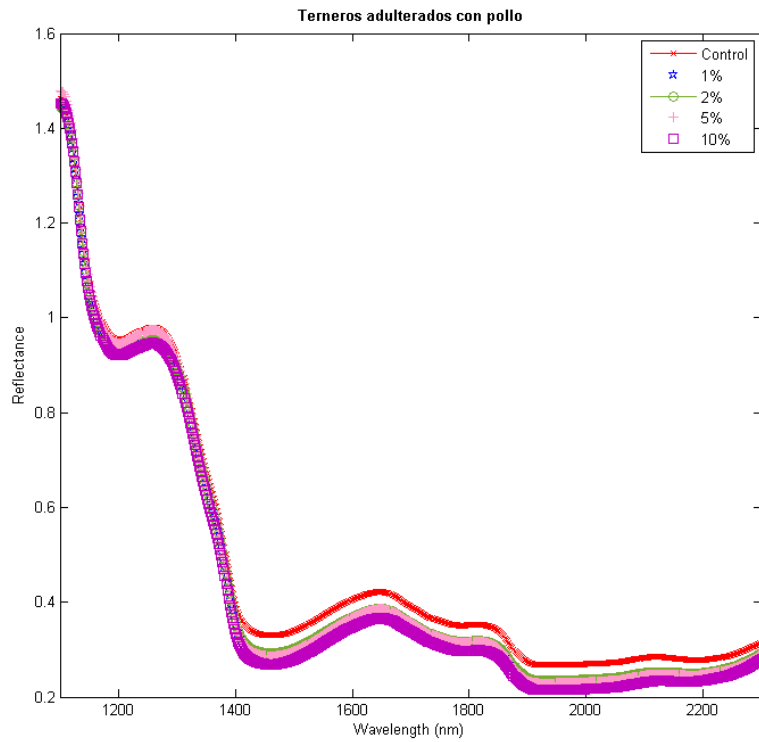


Figura 5.13. Espectros de reflectancia de muestras de carne de ternera adulterada con carne de pollo

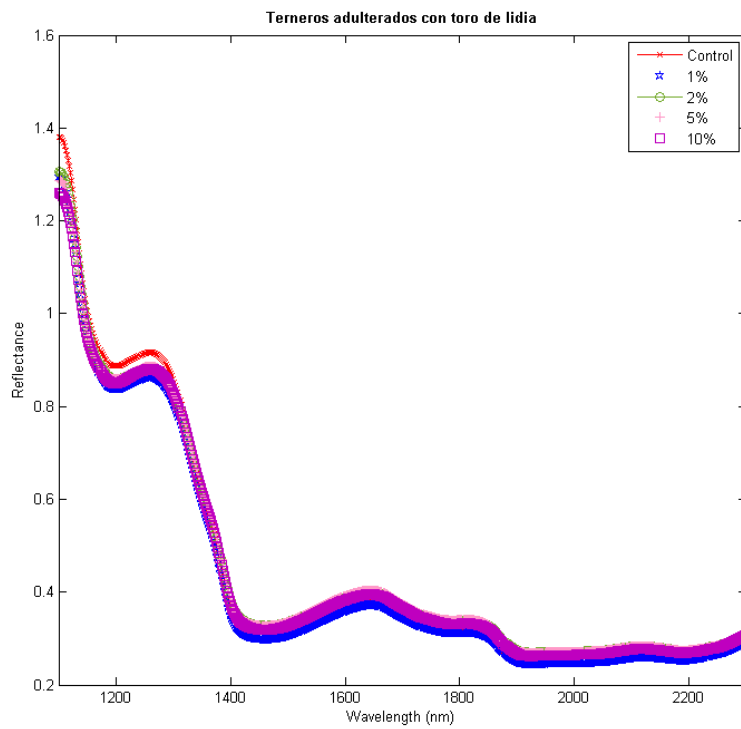


Figura 5.14. Espectros de reflectancia de muestras de carne de ternera adulterada con carne de toro de lidia

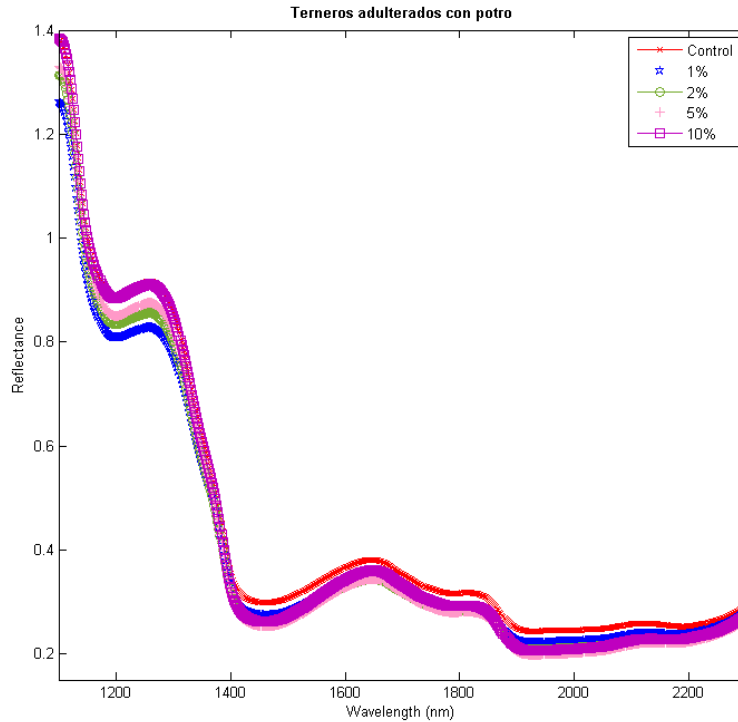


Figura 5.15. Espectros de reflectancia de muestras de carne de ternera adulterada con carne de potro

5.3.1 ACP

Se volvieron a realizar ACP para cada grupo de muestras adulteradas. Se aplicaron de nuevo los cinco pretratamientos mencionados en el experimento anterior.

Se realizó de nuevo una exploración visual de los resultados obtenidos con el objetivo de identificar los diferentes lotes empleados en el análisis.

En la tabla 5.10 se presenta el resumen de los resultados obtenidos con los ACPs con cada pretratamiento y cada grupo de muestras de carne de cordero adulteradas.

Tabla 5.10. Capacidad de detección de adulteraciones en carne de cordero mediante NIRS, usando diferentes pretratamientos en un ACP.

Pretratamiento	Cc	Cp	Ct	Cpt
1D	X	X	✓	X
1D+MSC	X	X	✓	X
MSC	X	X	✓	X
DT	X	X	✓	X
MSC+DT	X	X	✓	X

Cc: cordero-cerdo; Cp; cordero-pollo; Ct: cordero-toro de lidia; Cpt: cordero-potro.

“X”: El pretratamiento no diferencia entre grupos; “✓”: El pretratamiento si diferencia entre grupos

Tal y como se puede observar en la tabla 5.10, los ACP realizados en los grupos de muestras de carne de cordero adulteradas con cerdo (Cc), pollo (Cp) y potro (Cpt), no muestran ninguna capacidad de detección de adulteraciones con ninguno de los pretratamientos realizados, representado con el signo “X”. Es decir, de los cinco grupos de muestras (control, adulteradas al 1%, al 2%, al 5% y al 10%) no se puede diferenciar claramente uno de otro (Figura 5.16).

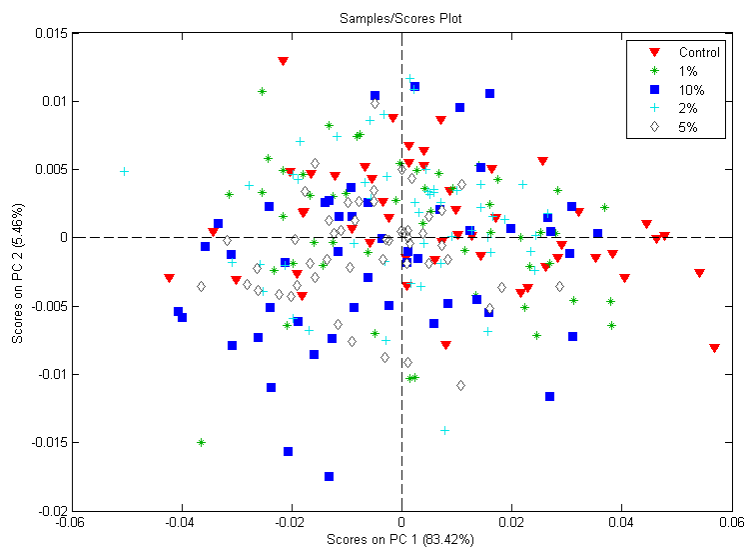


Figura 5.16. ACP de las muestras de carne de cordero adulteradas con pollo, 3PC y pretratamiento 1D.

Para el caso de las muestras de cordero adulteradas con toro de lidia (Ct), todos los pretratamientos ayudan a tener una diferenciación entre el grupo de muestras control y el grupo de muestras adulteradas al 10%, representadas con el símbolo “✓”. Este resultado indica que es posible detectar mediante la técnica NIR las adulteraciones al 10% en carne de cordero con carne de toro de lidia.

En las figuras 5.17 y 5.18 se presentan ejemplos del ACP de carne de cordero adulterada con toro de lidia, al que se le aplicaron los pretratamientos MSC y DT respectivamente.

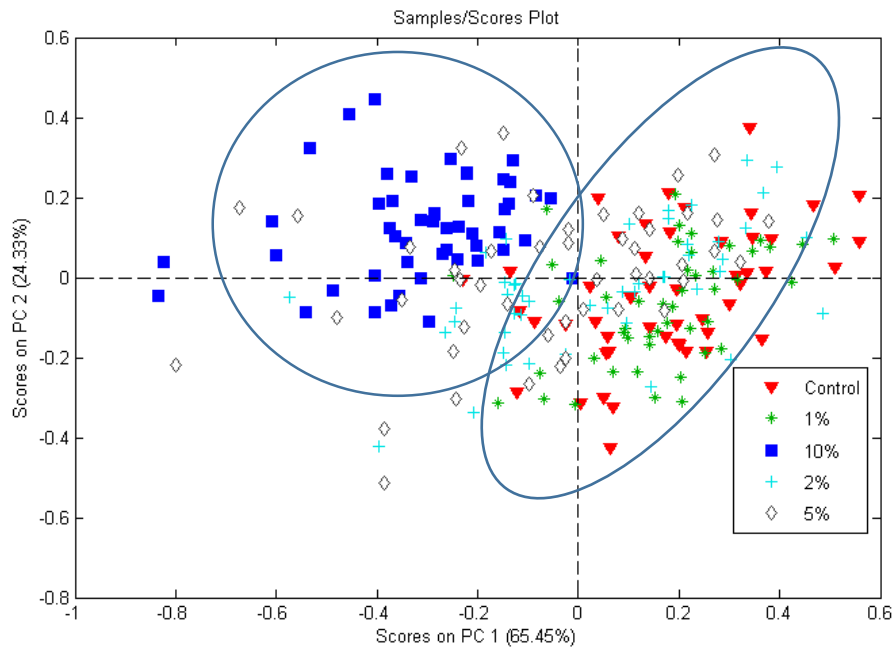


Figura 5.17. ACP de las muestras de carne de cordero adulteradas con toro de lidia, 8PC y pretratamiento MSC.

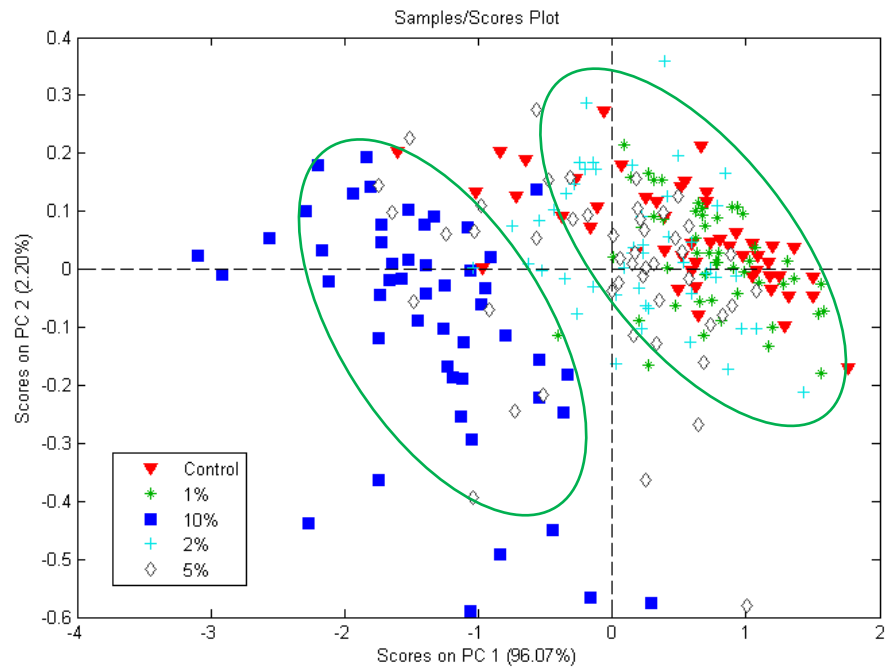


Figura 5.18. ACP de las muestras de carne de cordero adulteradas con toro de lidia, 8PC y pretratamiento DT.

Para el análisis de muestras de ternera mediante ACP, se aplicaron los mismos pretratamientos que en el caso de la carne de cordero y se obtuvieron los resultados que se presentan en la tabla 5.11.

Tabla 5.11. Capacidad de detección de adulteraciones en carne de ternera mediante NIRS, utilizando diferentes pretratamientos en un ACP.

Pretratamiento	T _c	T _p	T _t	T _{pt}
1D	X	X	X	X
1D+MSC	X	X	X	X
MSC	X	X	X	X
DT	X	X	✓	X
MSC+DT	X	X	X	X

Tal y como se observa en la tabla 5.11, el pretratamiento con el que se consigue una diferenciación clara entre el grupo de muestras no adulteradas con alguno de los grupos de muestras adulteradas fue DT en ternera adulterada con toro de lidia. En este caso, al igual que para la carne de cordero, los grupos que se pueden diferenciar son las muestras control con las muestras adulteradas al 10% (figura 5.19). Al igual que en el caso anterior, no se observan distinciones claras entre los lotes a menor porcentaje de adulteración.

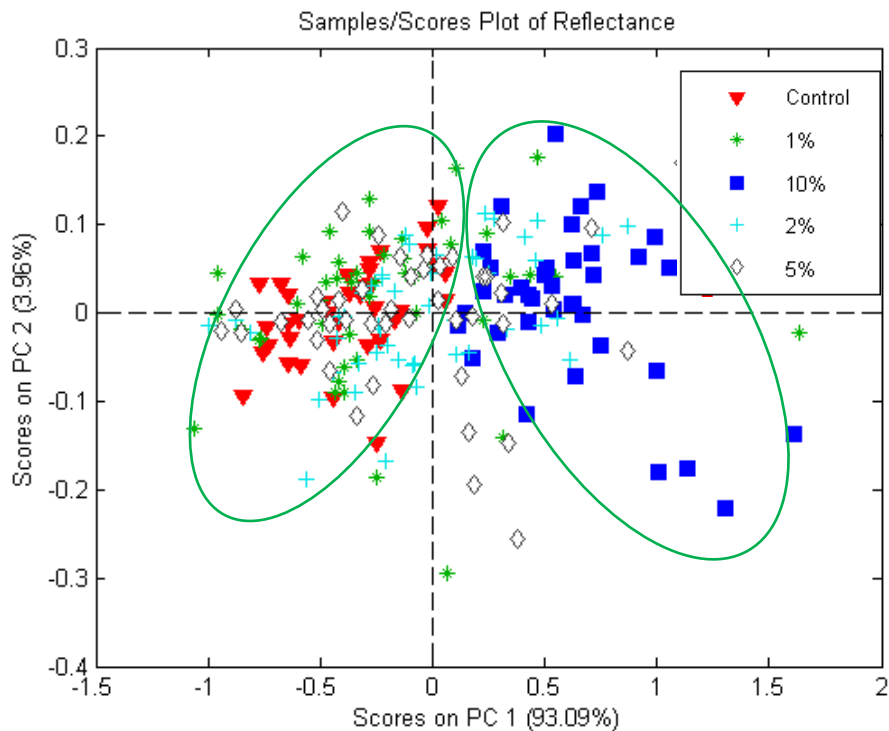


Figura 5.19. . ACP de las muestras de carne de ternera adulteradas con toro de lidia, 8PC y pretratamiento DT.

5.3.2 PLS-DA

Una vez realizados los ACP, se observó que el pretratamiento con el que mejores resultados se obtuvieron fue Detrending (DT). Por lo tanto, se procedió a realizar los distintos PLS-DA aplicando este pretratamiento con los ocho grupos de muestras.

El análisis discriminante PLS se realizó con cada grupo de muestras para intentar diferenciar entre las muestras control y las muestras adulteradas con los diferentes porcentajes. Se procedió al análisis incluyendo los 5 lotes de muestras y los resultados obtenidos no fueron los esperados. Con el modelo propuesto no resultaba una clara separación entre las muestras no adulteradas y las adulteradas ya que los porcentajes de muestras bien clasificadas no superaban en la mayor parte de los casos el 70%. Además se observaba una confusión entre los lotes control y adulteradas al 1% y 2%, implicando unos resultados no fiables. Sin embargo, en todos los casos se observó una clara distinción entre los lotes control y adulteradas al 5% y 10%.

Por este motivo, se optó por tomar una nueva estrategia en el análisis PLS-DA para comprobar si se podían obtener clasificaciones más fiables. En el análisis de APC se pudo observar cómo las muestras con porcentajes de adulteración del 1%, 2% y 5% no se podían diferenciar de forma clara de las muestras control. Sin embargo, como se ha mencionado anteriormente, en el análisis PLS-DA realizado con los 5 lotes, se observó cómo los lotes de 5% y 10% se distinguían notablemente del resto, por lo que se realizó un análisis teniendo en cuenta únicamente los 3 grupos mencionados: control, adulteradas al 5% y adulteradas al 10%.

En la tabla 5.12 se presentan los porcentajes de muestras bien clasificadas como control o como muestras adulteradas.

Tabla 5.12. Porcentaje de muestras de carne de cordero bien clasificadas como control o como adulteradas.

%	Grupo	Calibración (Cal)	Val. Cruzada (CV)	Val. Externa (Pred)
Cc	Control	53,84	48,46	51,78
	Adulteradas	88,70	82,25	88,88
Cp	Control	86,92	77,69	79,66
	Adulteradas	87,14	77,14	89,28
Ct	Control	83,82	84,55	93,22
	Adulteradas	87,22	84,21	82,14
Cpt	Control	89,92	89,20	81,03
	Adulteradas	96,87	93,75	100

Tal y como se observa en la tabla 5.12, los porcentajes de muestras bien clasificadas son, en general, superiores al 80%. Así, por ejemplo, en el caso de carne de cordero adulterada con carne de potro, se tienen porcentajes de muestras bien clasificadas mayores del 90% en las muestras adulteradas y de un 89% para las muestras control. En el caso de las muestras de cordero adulteradas con cerdo, el modelo muestra unos porcentajes de clasificación bajos para las muestras control. Este resultado indica la dificultad del modelo para identificar muestras adulteradas de carne de cordero con carne de cerdo y, a su vez, este resultado puede deberse a una similitud mayor entre la carne de cerdo y la carne de cordero.

Estos porcentajes de muestras bien clasificadas están relacionados directamente con los parámetros sensibilidad y especificidad que indican la precisión del modelo PLS-DA. La sensibilidad representa la proporción de muestras de un grupo A bien clasificadas dentro del grupo A. La especificidad indica la proporción de muestras del mismo grupo A, que pertenecen a otro grupo B, clasificadas como muestras del grupo B. En la tabla 5.13 se presentan los valores de sensibilidad y especificidad de los diferentes grupos para los modelos de calibración (Cal), Validación cruzada (CV) y validación externa o predicción (Pred).

Tabla 5.13. Proporciones de sensibilidad y especificidad en carne de cordero adulterada.

		Sensibilidad			Especificidad		
		Cal	CV	Pred	Cal	CV	Pred
Cc	C	0,600	0,523	0,554	0,758	0,710	0,815
	5%	0,806	0,645	0,643	0,565	0,534	0,493
	10%	0,968	0,871	0,769	0,764	0,745	0,700
Cp	C	0,829	0,779	0,814	0,843	0,757	0,857
	5%	0,800	0,714	0,867	0,680	0,611	0,750
	10%	0,829	0,743	0,769	0,749	0,737	0,757
Ct	C	0,868	0,853	0,949	0,860	0,825	0,714
	5%	0,714	0,679	0,769	0,709	0,703	0,716
	10%	0,966	0,931	0,933	0,896	0,902	0,917
Cpt	C	0,928	0,921	0,845	0,922	0,891	1,000
	5%	0,935	0,935	1,000	0,750	0,738	0,639
	10%	0,939	0,939	1,000	0,847	0,829	0,795

En la tabla 5.13, se puede observar que los parámetros que presentan valores más bajos son los de las muestras adulteradas con carne de cerdo. Sin embargo, para los otros tres grupos de muestras adulteradas, se tienen proporciones por encima de 0,8. Así, por ejemplo para las muestras adulteradas con carne de toro o potro, los valores de sensibilidad y especificidad en las muestras control y las muestras adulteradas al 10%, superan el 0,9 de proporción de muestras bien clasificadas.

Según los resultados obtenidos con los modelos en el análisis PLS-DA para carne de cordero adulterada, se puede decir que, en general, las adulteraciones con carne de potro y de toro de lidia se detectan con mayor precisión que las adulteraciones con carne de cerdo o de pollo. Por otro lado, obviamente las adulteraciones con mayor porcentaje de carne de otra especie (5% o 10%) son más fácilmente detectables que las adulteraciones con porcentajes muy bajos (1% o 2%). Por lo tanto, estos resultados nos indican que es posible detectar adulteraciones con un porcentaje mayor al 5% de las especies potro y toro de lidia en cordero, mediante tecnología NIRS y análisis quimiométrico.

Tabla 5.14. Porcentaje de muestras de carne de ternera bien clasificada como control o adulteradas.

%	Grupo	Calibración (Cal)	Val. Cruzada (CV)	Val. Externa (Pred)
T _c	Control	82,82	81,81	88,23
	Adulteradas	86,36	86,36	85,18
T _p	Control	78,12	71,87	73,68
	Adulteradas	83,6	80,32	70,83
T _t	Control	88,35	89,32	85,70
	Adulteradas	87,30	87,30	92,30
T _{pt}	Control	83,83	81,81	87,80
	Adulteradas	94,82	87,93	90,90

Del mismo modo que en el caso de las muestras de cordero, se observa en la tabla 5.14 que los porcentajes de muestras bien clasificadas son, en general, superiores al 80%. En el caso de carne de ternera adulterada con carne de potro, se tienen porcentajes de muestras bien clasificadas mayores del 94% en las muestras adulteradas y de un 83% para las muestras control. En general, los porcentajes de muestras bien clasificadas superan el 80% en todos los casos, excepto en el caso de las muestras adulteradas con carne de pollo, en el que los porcentajes apenas superan el 70%.

Tal y como se ha mencionado anteriormente, estos porcentajes de muestras bien clasificadas están relacionados directamente con los parámetros sensibilidad y especificidad que indican la precisión del modelo PLS-DA. En la tabla 5.15 se presentan los valores de sensibilidad y especificidad de los diferentes grupos para los modelos de calibración (Cal), Validación cruzada (CV) y validación externa o predicción (Pred).

Tabla 5.15. Proporciones de sensibilidad y especificidad en carne de ternera adulterada.

		Sensibilidad			Especificidad		
		Cal	CV	Pred	Cal	CV	Pred
T _c	C	0,859	0,848	0,738	0,879	0,833	0,841
	5%	0,618	0,559	0,538	0,702	0,702	0,554
	10%	0,844	0,844	0,857	0,872	0,865	0,873
T _p	C	0,792	0,740	0,763	0,820	0,787	0,750
	5%	0,818	0,818	0,692	0,613	0,597	0,653
	10%	0,857	0,821	0,909	0,837	0,783	0,784
T _t	C	0,902	0,902	0,881	0,859	0,859	0,923
	5%	0,758	0,727	0,929	0,699	0,699	0,648
	10%	0,833	0,800	0,917	0,860	0,838	0,786
T _{pt}	C	0,879	0,848	0,878	0,897	0,845	0,909
	5%	0,903	0,742	0,818	0,817	0,794	0,846
	10%	0,963	0,963	0,727	0,862	0,838	0,865

En la tabla 5.15, se puede observar que los parámetros que presentan valores más bajos son los de las muestras adulteradas con carne de pollo. Sin embargo, para los otros tres grupos de muestras adulteradas, se tienen proporciones por encima de 0,8 salvo para las muestras adulteradas al 5%. Así, por ejemplo para las muestras adulteradas con carne de toro, los valores de sensibilidad y especificidad en las muestras control y las muestras adulteradas al 10%, superan el 0,95 de proporción de muestras bien clasificadas.

Según los resultados obtenidos con los modelos en el análisis PLS-DA para carne de ternera adulterada, se puede decir que, en general, las adulteraciones con carne de cerdo, potro y de toro de lidia se detectan con mayor precisión que las adulteraciones con carne de pollo. Por otro lado, obviamente las adulteraciones con mayor porcentaje de carne de otra especie (5% o 10%) son más fácilmente detectables que las adulteraciones con porcentajes muy bajos (1% o 2%). Por lo tanto, estos resultados nos indican que es posible detectar adulteraciones con un porcentaje mayor al 5% de las especies potro y toro de lidia en ternera, siendo más fiables los resultados obtenidos con un porcentaje de adulteración del 10% en ambos casos.

Según estudios recientes, la tecnología NIRS resulta ser una herramienta útil para la identificación de carne de distintas especies (Cozzolino & Murray, 2004). Del mismo modo, esta técnica demuestra potencial en la autenticación de carne de distintas especies, a falta de algún estudio a nivel industrial para su posible aplicación *in situ* (Kamruzzaman et al., 2012).

6. CONCLUSIONES

Una vez realizados los tres experimentos objeto de este trabajo, se presentan las siguientes conclusiones:

- Se observa un espectro característico para cada especie (cordero y ternera) con diferentes valores de reflectancia a lo largo del espectro NIR. El espectro de reflectancia de carne de cordero presenta valores más altos que el espectro de carne de ternera. Las zonas de absorción del agua en las que se observa un pico característico se corresponden con las longitudes de onda 1450 nm y 1900 nm, pertenecientes al grupo funcional O-H y, la zona de absorción de grasa en el rango de 1200 nm que pertenece al grupo funcional C-H.
- Empleando la tecnología NIRS se puede discriminar entre muestras de carne de cordero alimentados con cebada frente a muestras de corderos alimentados con chia con un alto porcentaje de fiabilidad. De la misma manera, se puede decir que se consigue una clasificación bastante precisa entre muestras de carne de terneros alimentados con cebada frente a muestras de terneros sometidos a alimentación con lino + vitamina E.
- Además se puede afirmar que es posible utilizar esta tecnología para autenticar muestras de cordero y ternera adulteradas con carne de toro y potro con un porcentaje igual o superior al 5%. Asimismo, se ha comprobado cómo esta autenticación no resulta tan clara cuando la adulteración se realiza con carne de pollo y cerdo. De igual manera, cuando las adulteraciones son inferiores o iguales a un 2% no es posible detectarlas mediante los métodos empleados en este estudio.

Si bien es cierto que se plantea un análisis con mayor número y variabilidad de muestras como futura línea de investigación, se puede concluir que este estudio podría servir a la industria alimentaria para detectar posibles fraudes realizados tanto en el sistema de alimentación de los animales a lo largo de su vida, como en la comercialización de la carne, adulterándola con otra de menor calidad o precio.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Abeni, F. & Bergoglio, G. (2001). Characterization of different strains of broiler chicken by carcass measurements, chemical and physical parameters and NIRS on breast muscle. *Meat Science* 57: 133-137.
- Aberle, E.D.; Forrest, J.C.; Gerrard, D.E.; Mills, E.W.; Hedrick, H.B.; Judge, M.D. and Merkel, R.A. (2001). Growth and development of carcass tissues. In: *Principles of Meat Science*. (Eds. Aberle, E.D.; Forrest, J.C.; Gerard, D.E. & Mills, E.W.), pp. 45-67. Kendall/Hunt Publishing Company. Dubuque, Iowa, USA.
- Alomar, D.; Gallo, C.; Castañeda, M. & Fuchslocher, R. (2003). Chemical and discriminant analysis of bovine meat by near infrared reflectance spectroscopy (NIRS). *Meat Science* 63: 441-450.
- Andersen, H.J.; Oksbjerg, N. & Therkildsen, M. (2005). Potential quality control tools in the production of fresh pork, beef and lamb demanded by the European society. *Livestock Production Science* 94: 105-124.
- Andrés, S., Silva, A., Soares-Pereira, A. L., Martins, C., Bruno-Soares, A. M., & Murray, I. (2008). The use of visible and near infrared reflectance spectroscopy to predict beef *M. longissimus thoracis et lumborum* quality attributes. *Meat Science*, 78(3), 217-224.
- Ayerza, R. & Coates, W. (2006). Chia - redescubriendo un olvidado alimento de los aztecas. Ed. Del Nuevo Extremo.
- Ballabio D, Consonni V, (2013) Classification tools in chemistry. Part 1: Linear models. *PLS-DA. Analytical Methods*, 5, 3790-3798.
- Ballin, N. Z., & Lametsch, R. (2008). Analytical methods for authentication of fresh vs. thawed meat—A Review. *Meat Science*, 80(2), 151-158.
- Ben-Gera, I. & Norris, K. (1968). Direct spectrophotometric determination of fat and moisture in meat products. *J. Food Sci.*, 33:64.
- Bennet, H. S. (1960). *The Structure and Function of Muscle*, vol. 1 (Ed. G. H. Bourne), p. 137, Academic Press, New York.

- Bergera, G., Jarén, C., Arazuri, S. (2006). Introducción a la espectroscopia de infrarrojo cercano. *Horticultura Internacional* 52: 58-62.
- Beriain, M. J., A. Purroy, A. Horcada, J. Chasco, G. Lizaso, J.A. Mendizabal, & Mendizabal J. (1993). Calidad y composición de la carne de corderos de las razas Latxa y raza Aragonesa. *ITEA Vol. extra N° 12. Tomo II. p. 651-653.*
- Beriain, M.J. y Lizaso, G. (1998). Calidad de la carne de vacuno. En: *Vacuno de Carne: Aspectos Claves* (Coord. Buxadé, C.), pp. 495-510. Mundi-Prensa, Madrid, España.
- Bertrand, D. & Dufour, E. (2000). *La spectroscopie infrarouge et ses applications analytiques.* Editions TEC & DOC, Paris, France.
- Bertrand, D. (1993). Data pre-treatment and original analysis in spectroscopy. En *Advanced Comet Chemometrics School. Libramont Belgium April 26-28 1993.*
- Berzaghi, P., Dalla Zotte, A., Jansson, L. M., & Andrighetto, I. (2005). Near-infrared reflectance spectroscopy as a method to predict chemical composition of breast meat and discriminate between different n-3 feeding sources. *Poultry Science*, 84, 128–136.
- Brimrose. (1997). *Snap! Software manual. User's Manual*
- Briskey, E.J.; Bray, R.V.; Hoekstra, W.G.; Philleps, P.H. & Grummer, R.H. (1959). The effects of exhaustive exercise and high sucrose regime on certain chemical and physical pork ham muscle characteristics. *Journal of Animal Science* 18: 173.
- Brøndum, J.; Munck, L.; Henckel, P.; Karlsson, A.; Tornberg, E. & Engelsen, S.B. (2000). Prediction of water-holding capacity and composition of porcine meat by comparative spectroscopy. *Meat Science* 55: 177-185.
- Brunsø, K.; Bredahl, L.; Grunert, K.G. & Scholderer, J. (2005). Consumer perception of the quality of beef resulting from various fattening regimes. *Livestock Production Science* 94: 83-93.
- Burns, D.A. & Ciurczak, E.W. (1992). *Handbook of near infrared analysis.* (eds.). Marcel Dekker, New York, NY, USA.

- Byrne, R.J., Cotton, D., Porterfield, J., Wolschlag, C., & Ueblicher, G. (1998). "Manual for Design and Construction monitoring of Soil Nail Walls," Report FHWA-DP-96-69R, Federal Highway Administration, Washington, D.C.
- Calvo, C.; López, M.; Sánchez, B.; Dios, A. y Sánchez L. (1997). Predicción de las características de composición de la carne de ovino gallego mediante espectroscopia infrarroja cercana. ITEA. Vol. Extra 18: 658-660.
- Capillo Álvarez, J.E. y De Arcos Nieto-Guerrero, R. (2001). Valor nutritivo de la carne. La carne en la dieta humana. Implicaciones sanitarias del consumo de carne. En: Enciclopedia de la Carne y de los Productos Cárnicos (Coord. Martín Bejarano, S.), pp. 569-584. Martín & Macías, Cáceres, España.
- Cerdeño, A.; López, J.; Gómez, A.; Serrano, E. y Mantecón, A.R. (2001). Características de la carne de buey de las razas: Asturiana de los Valles, Limusín y Parda. ITEA. Vol. Extra 23: 532-534.
- Chen, Z.; Yi-yu, C. & Hai-bin, Q. (2005). A new approach to the fast measurement of content of amino acids in *Cordyceps sinensis* by ANN-NIR. *Guang Pu Xue Yu Guang Pu Fen Xi* 24: 50-53.
- Chrystall, B. (1982). Recent and potential changes in meat processing and their implications for producers. In: Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production, pp. 103-106. Meat Industry Research Institute of New Zealand Inc., Hamilton, New Zealand.
- Cordella, C., Moussa, I., Martel, A. (2002). Recent developments in food characterization and adulteration detection: technique-oriented perspectives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 1751-1764.
- Cozzolino, D. & Murray, I. (2002). Effect of sample presentation and animal muscle species on the analysis of meat by near infrared reflectance spectroscopy. *Journal of Near Infrared Spectroscopy* 10: 37-44.
- Cozzolino, D. & Murray, I. (2004). Identification of animal meat muscles by visible and near-infrared reflectance spectroscopy. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie*, 37, 447-452.

- Cozzolino, D.; Chree, A.J.; Scaife, R. & Murray, I. (2005). Usefulness of near-infrared reflectance (NIR) spectroscopy and chemometrics to discriminate fishmeal batches made with different fish species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 4459 - 4463.
- Cozzolino, D.; De Mattos, D. & Martins, V. (2002). Visible/near infrared reflectance spectroscopy for predicting composition and tracing system of production of beef muscle. *Animal Science* 74: 477-484.
- Cozzolino, D.; Murray, I. & Paterson, R. (1996). Visible and near infrared reflectance spectroscopy for the determination of moisture, fat and protein in chicken breast and thigh muscle. *Journal of Near Infrared Spectroscopy* 4: 213-223.
- Cozzolino, D.; Murray, I.; Scaife, J.R. & Paterson, R. (2000). Study of dissected lamb muscles by visible and near infrared reflectance spectroscopy for composition assessment. *Animal Science* 70: 417-423.
- Cuesta, L. M.; Gil, A. J. y Remiro, F. (1991). *Electrónica analógica*. Ed. McGraw Hill, Madrid.
- Dardenne, P. (2000). Editorial. Authentification des productions agricoles et agroalimentaires: nouveau challenge analytique. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, 4:195.
- Davies, T. (1998). The history of near infrared spectroscopic analysis: Past, present and future "From sleeping technique to the morning star of spectroscopy" *Analisis* 26 (4): 17-19.
- De Maesschalck, R., Jouan-Rimbaud, D. & Massart, D.L. (2000). Tutorial: the Mahalanobis distance. *Chem. Intell. Lab. Syst.*, 50:1-18.
- De Marchi, M., Riovanto, R., Penasa, M., Cassandro, M. (2012). At-line prediction of fatty acid profile in chicken breast using near infrared reflectance spectroscopy. *Meat Science* 90, 653-657.
- Destefanis, G.; Brugiapaglia, A.; Barge, M.T. & Lazzaroni, C. (2003). Effect of castration on meat quality in Piemontese cattle. *Meat Science* 64: 215-218.
- Ding, H.B. & Xu, R.-J. (1999). Differentiation of beef and Kangaroo meat by visible/near-infrared reflectance spectroscopy. *Journal of Food Science*, 64(5), 814-817.

- Downey, G. & Hildrum, K.I. (2004). Analysis of Meats. In: Near-Infrared Spectroscopy in Agriculture (Eds. Al-Amoodi, L.; Craig, R.; Workman, J. & Reeves III, J.), pp. 599-632. American Society of Agronomy Inc., Crop Science Society of America Inc., Soil Science Society of America Inc. Madison, Wisconsin, USA.
- Downey, G. (1996). Authentication of food and food ingredients by near-infrared spectroscopy. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 4, 47-61.
- Downey, G. McElhinney, J. & Fearn, T. (2000). Species identification in selected raw homogenized meats by reflectance spectroscopy in the mid-infrared, near-infrared, and visible ranges. *Applied Spectroscopy*, 54(6), 894-899.
- Eichinger, H. & Beck, G. (1992). Possibilities for improving breeding value estimation of meat quality in cattle by using the near-infrared measurement technique. *Archiv für Tierzucht* 35: 41-50.
- Eliécer, J., Palau, F. J. y Ramírez, C. (2001). Espectroscopía de infrarrojo cercano- NIR. Determinación de nitrógeno en tejido foliar de caña de azúcar. *Serie de Procesos Industriales*, 1. ISSN: 1657-7329.
- Elmore, J.S., Sarah, L. C., Enser M., Mottram, D. S., Sinclair, L. A., Wilkinson, R. G., & Wood, J. D. (2005). Dietary manipulation of fatty acid composition in lamb meat and its effect on the volatile aroma compounds of grilled lamb. *Meat Science* 69, 233-242.
- Esbensen, K., Schönkopf, S. & Midtgaard, T. (1994). *Multivariate analysis in practice*. CAMO A/S, Trondheim, Norway.
- Eurocarne. (2012). El vacuno de lidia como productor de carne de calidad. *Marza*, 204, 112.
- Fernández Cabanas, V. (2003). Métodos de procesamiento de la señal espectroscópica NIRS: Aplicación al análisis cuantitativo y cualitativo de productos agroalimentarios, Tesis Doctoral, Universidad de Córdoba, España.
- Franco, D., Rodríguez, E., Purriños, L., Crecente, S., Bermudez, R., & Lorenzo, J. M. (2011). Meat quality of “Galician Mountain” foals breed. Effect of sex, slaughter age and livestock production system. *Meat Science*, 88, 292-298.
- Fumière, O., Sinnaeve, G. & Dardenne, P. (2000). Attempted Authentication of cut pieces of chicken meat from certified production using near-infrared spectroscopy. *Journal of Near-Infrared Spectroscopy*, 8, 27-34.

- Garrido, A. (1999). Tecnología NIRS, aplicaciones en productos agroalimentarios. UPNA, Pamplona.
- Geladi, P. (2003). *Spectrochim. Acta B*, 58(5), 767.
- Geladi, P., MacDougall, D., Martens, H. (1985). *Appl. Spectrosc.*, 39(3), 491.
- Hammond, J. (1955). Quality meat production. *Journal of Yorkshire Agriculture Society* 1:19-32.
- Hawthorn, John (1983). *Fundamentos de ciencia de los alimentos*. (Ed. Acribia), p. 79, Zaragoza, Spain. I.S.B.N 84-200-0521-5.
- Heise, H.M. & Winzen, R. (2002). Fundamental chemometric methods. In: *Near-Infrared Spectroscopy. Principles, Instruments, Applications*. (Eds. Siesler, H.W.; Ozaki, Y.; Kawata, S. & Heise, H.M.), pp. 125-162. WILEY-VCH Verlag GmbH, Weinheim, Germany.
- Hernandez, G. A. (2010). *Tratado de nutrición: composición y calidad nutritiva de los alimentos*, tomo II, pg 113, Panamericana, Madrid, España.
- Hollas, J. M. *Modern Spectroscopy 4th Edition*, John Wiley & Sons, 2004.
- Hoving-Bolink, A.H; Vedder, H.W.; Merks, J.W.M.; De Klein, W.J.H.; Reimert, H.G.M.; Frankhuizen, R.; Van Den Broekb, W.H.A.M. & En Lambooi, E. (2005). Perspective of NIRS measurements early post mortem for prediction of pork quality. *Meat Science* 69: 417-423.
- Hruschka, W.R. (1987). Data Analysis: Wavelength selection methods. En *Near Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries*. William, P. and Norris, K. (eds.). American Association of Cereal Chemist Inc., St. Paul, Minnesota, USA. p. 35-55.
- Isaksson, T. & Naes, T. (1990). Selection of samples for calibration in near infrared spectroscopy. Part II: Selection based on spectral measurement. *Appl. Spectrosc.*, 44, 1152-1158.
- Isaksson, T.; Nilsen, B.N.; Tøgersen, G.; Hammond, R.P. & Hildrum, K.I. (1996). On-line, proximate analysis of ground beef directly at a meat grinder outlet. *Meat Science* 43: 245-253.

- Jackson, J.E. (1991). *User's Guide to Principal Components*, Wiley, New York.
- Kaffka, K. & Giarmati, L.S. (1995). Quality determination in the food industry. En *Leaping ahead with near infrared spectroscopy*. Batten, G.D., Flinn, P.C., Welsh, L.A. and Blakeney, A.B. (eds.). NIR Spectroscopy Group, Royal Australian Chemistry Institute, Melbourne, Australia. p. 261-269.
- Kamruzzaman, M., Barbin, D., ElMarsy, G., Sun, D.-W., Allen, P. (2012). Potential of Hyperspectral imaging and pattern recognition for categorization and authentication of red meat. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 16, 316-325.
- Karoui, R & De Baerdemaeker, J. (2007). A review of the analytical methods coupled with chemometric tools for the determination of the quality and identity of dairy products. *Food Chemistry*, 102, 621-640.
- Karoui, R; Downey, G.; Blecker, C. (2010). Mid-Infrared Spectroscopy Coupled with Chemometrics: A Tool for the Analysis of Intact Food Systems and the Exploration of Their Molecular Structure-Quality Relationships-A Review. *Chemical Reviews*, 110, 6144-6168.
- Kestens, V., Charoud-Got, J., Bau, A., Bernreuther, A., & Emteborg, H. (2008). Online measurement of water content in candidate reference materials by acoustooptical tuneable filter near-infrared spectrometry (AOTF-NIR) using pork meat calibrants controlled. *Food Chemistry*, 106, 1359–1365.
- Kowalski, B., Bender, C., Am, J. (1972). *Chem. Soc.*, 94(16), 5632.
- Kruggel, W.G.; Field, R.A.; Riley, M.L.; Radloff, H.D. & Horton, K.M. (1981). Near-infrared reflectance determination of fat, protein, and moisture in fresh meat. *Journal of Association of Official Analytical Chemist* 64: 692-696.
- Lanza, E. (1983). Determination of moisture, protein, fat, and calories in raw pork and beef by near infrared spectroscopy. *Journal of Food Science* 48: 471-474.
- Lawrie, R. A. (1977). *Ciencia de la Carne*, pg. 91. Acribia, Zaragoza, España.
- López, A., Arazuri, S., García, I., Mangado, J., Jarén, C. (2013). A Review of the Application of Near-Infrared Spectroscopy for the Analysis of Potatoes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 5413-5424.

- Mark, H. 1992. Qualitative discriminant analysis. En Handbook of near-infrared analysis. Burns, D.A. and Ciurczak, E.W. (eds.). Marcel Dekker, New York, NY, USA. p. 329-363.
- Martens, H., & Næs, T. (1989). Multivariate calibration. New York, NY: John Wiley & Sons.
- Martens, H., Martens, M. (2001). Multivariate Analysis of Quality. An Introduction, John Wiley and Sons Inc., Chichester, UK.
- Masoero, G.; Xiccato, G.; Dalle Zotte, A.; Parigi Bini, R. & Bergoglio, G. (1994). Analysis of freeze-dried rabbit meat by NIRS. *Zootecnica e Nutrizione Animale* 20: 319-329.
- Massart, D. L., Vandeginste, B. G. M., Deming, S. N., Michotte, Y., Kaufman, L. (1988). *Chemometrics: A textbook*, Elsevier Science Publisher, New York, USA.
- Massart, D.L., Vandeginste, B.G.M., Buydens, L.M.C., De Jong, S., Lewi, P.J. & Smeyers-Verdeke, J. (1997). *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics* (2 vol.). Elsevier Science Pub., Amsterdam, The Netherlands.
- McClure, W.F. (1992). Making light work: lighting new frontiers. En. Making light work: advances in near infrared spectroscopy. Murray, I. and Cowe, I.A. (eds.). VCH. London, UK. p. 1-13.
- McClure, W.F. (2001). Near-infrared instrumentation. In: *Near-Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries* (Eds. Williams, P. and Norris, K.), pp. 109-128. American Association of Cereal Chemists Inc., St. Paul, Minnesota, USA.
- McElhinney, J., Downey, G. & O'Donnell, C. (1999). Quantification of lamp content in mixtures with raw minced beef using visible near and mid-infrared spectroscopy. *Journal of Food Science*, 64(4), 587-591.
- Mendizabal, J. A, Eguinoa, P., Arana, A., Maeztu, F., Insausti, K., Sarriés, M. V., Soret, B., Beriain, M. J., Purroy, A. (2011). Efecto de la utilización de chia (*salvia hispanica* l.) sobre el crecimiento y la calidad de la canal de corderos. primeros resultados. *Xiv Jornadas Sobre Producción Animal*. Zaragoza. pp. 634.
- Mitsumoto, M.; Maeda, S.; Mitsuhashi, T. & Ozawa, S. (1991). Near-infrared spectroscopy determination of physical and chemical characteristics in beef cuts. *Journal of Food Science* 56: 1493-1496.

- Monin, G. (1988). Stress d' abattage et qualités de la viande. *Recueil de Medecine Veterinaire* 16410: 835-842.
- Naes, T. & Isaksson, T. (1989). Selection of samples for near infrared spectroscopy. Part I: General principles illustrated by examples. *Appl. Spectrosc.*, 43:328-335.
- Naes, T., Isaksson, T., Fearn, T. & Davies, T. (2002). A user-friendly guide to multivariate calibration and classification. NIR Publications, Chichester, UK.
- O'Sullivan, A.; Galvin, K.; Moloney, A.P.; Troy, D.J.; O'Sullivan, K. & Kerry, J.P. (2003). Effect of pre-slaughter rations of forage and/or concentrates on the composition and quality of retail packaged beef. *Meat Science* 63: 279-286.
- Osborne, B.G. & Fearn, T. (1986). *Near Infrared Spectroscopy in Food Analysis*. Longman Scientific and Technical, Harlow, Essex, UK.
- Osborne, B.G., Fearn, T. & Hindle, P. (1993). *Practical NIR Spectroscopy with Applications in Food and Beverage Analysis*. Longman Scientific and Tecnnical. London, UK.
- Otto, M. (1999). *Chemometrics. Statistics and Computer Application in Analytical Chemistry*, Wiley-VCH, New York, USA.
- Parikh, R., Mathai, A., Parikh, S., Chandra, S. G., Thomas, R. (2008) Understanding and using sensitivity, specificity and predictive values. *Indian Journal of Ophthalmol*, 56:45–50.
- Park, B.; Chen, Y.R.; Hruschka, W.R.; Shackelford, S.D. & Koohmaraie, M. (1998). Near infrared reflectance analysis for predicting beef longissimus tenderness. *Journal of Animal Science* 76: 2115-2120.
- Prevolnik, M.; Candek-Potokar, M. & Škorjanc, D. (2004). Ability of NIR spectroscopy to predict meat chemical composition and quality: a review. *Czechoslovak Journal of Animal Science* 49: 500-510.
- Prevolnik, M.; Candek-Potokar, M.; Škorjanc, D.; Velikonja-Bolta, Š.; Škrlep, M.; Žnidaršič, T. & Babnik, D. (2005). Predicting intramuscular fat content in pork and beef by near infrared spectroscopy. *Journal of Near Infrared Spectroscopy* 13: 77-85.

- Price, J. F., Schweigert, B. S. (1976). *Science of Meat and Meat Products*, pg. 24, Acribia, Zaragoza, Spain.
- Prieto, N. (2006). Tesis: aplicación de la tecnología NIRS para estimar parámetros indicativos de la calidad de la carne de vacuno. Universidad de León, pp. 52.
- Prieto, N., Andrés, S., Giráldez, F. J., Mantecón, A. R., Lavín, P. (2006). Potential use of near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) for the estimation of chemical composition of oxen meat samples. *Meat Science* 74, 487-496.
- Prieto, N., Roehle, R., Lavín, P., Batten, G., Andrés, S. (2009). Application of near infrared reflectance spectroscopy to predict meat and meat products quality: A review. *Meat Science*, 83, 175-186.
- Puigdoménech, A. (1998). Optimització del control de qualitat en productes agrícoles mitjançant espectrometria d'infraroig proper (NIR): aplicació als farratges de Catalunya. Transferència d'equacions de calibratge multivariant en xarxes instrumentals. Tesi Doctoral. Universitat de Barcelona.
- Quaresima, V.; Lepanto, R. & Ferrari, M. (2003). The use of near infrared spectroscopy in sports medicine. *Journal of Sports Medicine and Physical Fitness* 43: 1-13.
- Rannou, H. & Downey, G. (1997). Discrimination of raw pork, chicken and turkey meat by spectroscopy in the visible, near- and mid-infrared ranges. *Analytical Communications*, 34, 401-404.
- Reich, G. (2005). Near-infrared spectroscopy and imaging: basic principles and pharmaceutical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews* 57: 1109-1143.
- Renand, G.; Picard, B.; Touraille, C.; Berge, P. & Lepetit, J. (2001). Relationships between muscle characteristics and meat quality traits of young Charolais bulls. *Meat Science* 59: 49-60.
- Renden, J.A.; Oates, S.S. & Reed, R.B. (1986). Determination of body fat and moisture in dwarf hens with near infrared reflectance spectroscopy. *Poultry Science* 65: 1539-1541.
- Rodbotten, R. (2000). Prediction of quality attributes from early post mortem near infrared reflectance spectra. *Food Chemistry* 69: 427-436.

- Rossier, E. & C. Berger. (1988). La viande de cheval: des qualites indiscutables et pourtant meconnues, *Cahiers de Nutrition et de Dietologie* 23(1), 35-40.
- Ruiz, M. (2013). Caracterización de la carne de potro de raza Burguete. Efecto de la maduración.
- Sanderson, R., Lister, S. J., Dhanoa, M. S., Barnes, R. J., & Thomas, C. (1997). Use of near infrared reflectance spectroscopy to predict and compare the composition of carcass samples from young steers. *Animal Science*, 65, 45-54.
- Sañudo, C.; Olleta, J. L.; Campo, M. M.; Alfonso, M. y Panea, B. (2001). Propuesta de muestreo. En: *Monografías INIA: Ganadera N.1. Metodología para el Estudio de la Calidad de la Canal y de la Carne de Rumiantes* (Coods. Cañeque, V. & Sañudo, C.), pg. 139-144. MCyT- INIA, Madrid, España.
- SAS. 1990. *SAS/STAT User's Guide Version 6*. SAS Institute Inc. (ed.). Cary, NC, USA.
- Scollan, N.D.; Richardson, I. & Moloney, A.P. (2005). Effect of beef systems on meat composition and quality. In: *The Science of Beef Quality*. 8th Annual Langford. Food Industry Conference. Proceedings of the British Society of Animal Science, May 18th- 19th, pp. 1-6. BSAS, Langford, Bristol, UK.
- Shenk, J.S & Westerhaus, M.O. (1991). Population definition sample selection and calibration procedures for near infrared spectra and modified partial leastsquares regression. *Crops Sci.*, 31:469-474.
- Shenk, J.S. & Westerhaus, M.O. (1995a). *Analysis of Agricultural and Food Products by Near Infrared Reflectance Spectroscopy*. Monograph. NIRSystems Inc., Silver Spring, MD, USA.
- Shenk, J.S. & Westerhaus, M.O. (1995b). *Routine operation, calibration, development and network system management manual*. NIRSystems Inc., Silver Spring, MD, USA.
- Shenk, J.S. & Westerhaus, M.O. (1996). Calibration the ISI way. En. *Near Infrared Spectroscopy: The Future Waves*. Davies, A.M.C. and Williams, P.C. (eds. NIR Publications, Chichester, UK. p. 198-202.
- Sivakesava, S. & Irudayaraj, J. (2002). Rapid determination of tetracycline in milk by FTMIR and FT-NIR spectroscopy. *Journal of Dairy Science* 85: 487-493.

- Skoog, D. A., Leary, J. J. (1996). *Análisis Instrumental*. Mac Graw-Hill, Interamericana, 296-339.
- Solís, M.; De Pedro, E.; Garrido, A.; Silió, J.G.L.; Rodríguez, C. y Rodríguez, J. (2001). Evaluación de la composición del lomo de cerdo ibérico mediante la tecnología NIRS. *ITEA*. Vol. Extra 22: 613-615.
- Stone, M. (1974). Cross-validation choice and assessment of statistical prediction. *J. R. Statist. Soc. B*, 39:111-133.
- Tøgersen, G.; Arnesen, J.F.; Nielsen, B.N. & Hildrum, K.I. (2003). On-line prediction of chemical composition of semi-frozen ground beef by non-invasive NIR spectroscopy. *Meat Science* 63: 515-523.
- Tøgersen, G.; Isaksson, T.; Nielsen, B.N.; Baker, E.A. & Hildrum, K.I. (1999). On-line NIR analysis of fat, water and protein in industrial scale ground meat batches. *Meat Science*. 51: 97-102.
- Valdes, E.V. & Summers, J.D. (1986). Determination of crude protein in carcass and breast muscle samples of poultry by near infrared reflectance spectroscopy. *Poultry Science* 65: 485-490.
- Van Kempen, L. (2001). Infrared technology in animal production. *World's Poultry Science Journal* 57: 29-48.
- Varela, A.; Oliete, B.; Monserrat, L.; Carballo, J.A. y Sánchez, L. (2001). Efecto de la extensificación del manejo sobre la dureza, jugosidad y composición química de la carne de terneros de raza Rubia Gallega sacrificados sin destetar. *ITEA*. Vol. Extra 22: 562-564.
- Varela, A.; Oliete, B.; Moreno, T.; Portela, C.; Carballo, J.A.; Sánchez, L. y Monserrat, L. (2003). Calidad de la carne de machos enteros y castrados de raza Rubia Gallega sacrificados con 24 meses. *Archivos de Zootecnia* 52: 347-358.
- Ventura Gayete, J. F. (2006). Tesis: Desarrollo de métodos analíticos medioambientalmente sostenibles por espectrometría FTIR. Valencia.
- Viljoen, M., Hoffman, L. C., & Brand, T. S. (2005). Prediction of the chemical composition of freeze-dried ostrich meat with near infrared reflectance spectroscopy. *Meat Science*, 69, 255–261.

- Viljoen, M., Hoffman, L. C., & Brand, T. S. (2007). Prediction of the chemical composition of mutton with near infrared reflectance spectroscopy. *Small Ruminant Research*, 69, 255-261.
- Vitale, R., Bevilacqua, M., Bucci, R., Magrì, A. D., Magrì, A. L., Marini, F. (2013). A rapid and non-invasive method for authenticating the origin of pistachio samples by NIR spectroscopy and chemometrics. *Chemometrics and intelligent Laboratory Systems*, 121, 90-99.
- Walls, E. W. (1960). *The Structure and Function of Muscle*, vol. 1 (Ed. G. H. Bourne), p. 21, Academic Press, New York.
- Wang, L. J., & Sun, D. W. (2002). Modelling vacuum cooling process of cooked meat – part 1: analysis of vacuum system. *International Journal of Refrigeration – Revue Internationale Du Froid*, 25(7), 854-861.
- Williams, P., & Norris, K. (2001). *Near-infrared technology in the agricultural and food industries* (2nd ed). St Paul, Minn. American Assn. of Cereal Chemists.
- Williams, P.C. & Norris, K. (1987). Qualitative applications of Near-Infrared Reflectance Spectroscopy. In P.C. Williams and K. Norris (ed.) *En Near-infrared technology in the agricultural and food industries*. Williams, P.C. and Norris, K. (eds.). American Association of Cereal Chemists Inc., St. Paul, MN, USA. p. 241-246.
- Williams, P.C. & Sobering, D., (1996). How do we do it: a brief summary of the methods we use in developing near infrared calibrations. *Near Infrared Spectroscopy: The Future Waves*. Davies, A.M.C. and Williams, P.C. (eds.). NIR Publications, Chichester, UK. p. 185-188.
- Wold, S., Sjöström, M. (1972). *Chem. Scripta*, 2, 49.
- Young, O.A.; Berker, G.J. & Frost, D.A. (1996). Determination of collagen solubility and concentration in meat by near infrared spectroscopy. *Journal of Muscle Foods* 7: 377- 387.
- Zamora-Rojas, E., Pérez-Marín, D., De Pedro-Sanz, E., Guerrero-Ginel, J. E., Garrido-Varo, A. (2012). In-situ Iberian pig carcass classification using a micro-electro-mechanical system (MEMS) based near infrared (NIR) spectrometer. *Meat Science* 90, 636-642.