

**Universidad Pública de Navarra**

***Nafarroako Unibertsitate Publikoa***

**ESCUELA TECNICA SUPERIOR  
DE INGENIEROS AGRONOMOS**

***NEKAZARITZAKO INGENIARIEN  
GOI MAILAKO ESKOLA TEKNIKO***

**EVALUACIÓN DEL PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS DE CARNE DE VACUNO  
MEDIANTE ESPECTROSCOPIA MIR.**

presentado por

**EDURNE BERUETE JORDANA-*k***

*aurkeztua*

**INGENIERO AGRONOMO  
*NEKAZARITZA INGENIARITZA***

**Febrero, 2015 / *2015ko, Otsailean***

Dña. María José Beriain Apesteguía, Catedrática del Área de Nutrición y Bromatología del Departamento de Ciencias del Medio Natural de la Universidad Pública de Navarra y D. Miguel Beruete Díaz, Doctor Ingeniero de Telecomunicaciones de la Universidad Pública de Navarra.

CERTIFICAN QUE:

Dña. Edurne Beruete Jordana ha realizado en el departamento de Ciencias del Medio Natural de la Universidad Pública de Navarra, bajo nuestra dirección, el trabajo final de carrera titulado "Evaluación del perfil de ácidos grasos de carne de vacuno mediante espectroscopia MIR" para optar al título de Ingeniero Agrónomo.

Revisado el trabajo, consideramos que reúne las condiciones necesarias para su defensa por lo que autorizamos la presentación del mismo.

Pamplona, 2 de Febrero de 2015.

Fdo. María José Beriain Apesteguía

Fdo. Miguel Beruete Díaz

## AGRADECIMIENTOS

*A M<sup>o</sup> José, mi tutora en este trabajo fin de carrera, por su ayuda y su apoyo durante todo este tiempo.*

*A Miguel, mi codirector, por mostrarme el mundo de la espectroscopia infrarroja y haberme dejado hacer uso de su equipo.*

*A María, por haber estado ahí en todo momento, por toda tu ayuda y tus consejos. Porque sin ti este trabajo hubiera durando unos cuantos meses más.*

*A Pablo, por ayudarme en la obtención de espectros y resolver mis dudas.*

*A Inma, por tu ayuda y por dejarme utilizar los datos de tu tesis.*

*A toda mi familia y en especial a mis padres, por su apoyo.*

*A Sandra, aunque hayas estado lejos has hecho todo lo posible por ayudar.*

*A Asier, por animarme y apoyarme.*

*Por último, a todas aquellas personas que se han preocupado por mí y que han hecho que este camino sea más llevadero.*

MUCHAS GRACIAS A TODOS

## Índice General

RESUMEN.....	1
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN.....	3
CAPÍTULO II. ANTECEDENTES.....	5
1. Características de la carne.....	6
1.1 Composición química de la carne.....	6
1.1.1 Composición química cualitativa.....	6
1.1.2 Composición química cuantitativa.....	8
1.2 Composición lipídica.....	8
1.3 Ácidos grasos.....	11
1.3.1 Ácidos grasos de interés nutricional.....	13
1.3.2 Rutas metabólicas de los ácidos grasos.....	14
2. Métodos de medida de la composición química.....	16
2.1 Composición lipídica.....	16
2.1.1 Procedimientos de extracción.....	17
2.1.2 Procedimientos volumétricos.....	18
2.1.3 Cromatografía gaseosa.....	19
3.1 Fundamento.....	21
3.2 Instrumentación.....	22
3.2.1 Espectrofotómetros dispersivos de red.....	22
3.2.2 Instrumentos basados en la transformada de Fourier.....	23
3.3 Comparación FT-NIR y FT-MIR.....	26
4.1 Determinación de la composición química de los alimentos.....	27
4.2 Detección la presencia de bacterias en alimentos.....	29
4.3 Determinación de la autenticidad de los alimentos.....	30
4.4 Determinación del sistema de producción de los alimentos.....	30
4.5 Aplicaciones de MIR en el análisis de muestras de carne.....	31
CAPÍTULO III: OBJETIVOS.....	34
CAPÍTULO IV. MATERIAL Y MÉTODOS.....	36
1. Diseño experimental.....	37

2. Material animal y alimentación.....	38
3. Análisis de las muestras. ....	40
3.1 Conservación y preparación de la muestra. ....	40
3.2 Determinación del contenido en lípidos totales.....	40
3.3 Tratamiento y preparación de las muestras para el análisis por FTIR. ....	42
3.4 Análisis mediante espectroscopia MIR. ....	42
4. Tratamiento estadístico de los datos. ....	43
CAPÍTULO V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	44
1. Cuantificación de la grasa intramuscular. ....	45
2. Características espectrales de las muestras. ....	46
2.1 Asignación de las bandas espectrales representativas de los espectros FTIR de las grasas.....	46
2.2 Presentación de las medidas espectrales de carne y grasa obtenidas a partir de los animales con espectroscopia FTIR-MIR. ....	50
2.2.1 Espectros FTIR-MIR de las muestras de carne. ....	50
2.2.2 Espectros FTIR-MIR de la grasa intramuscular extraída de las muestras... 52	
2.2.3 Comparación entre las medidas espectrales de la grasa intramuscular y de la carne de terneros. ....	54
3. Modelo de predicción del contenido de ácidos grasos de interés tecnológico y nutricional. ....	54
4. Análisis de Componentes Principales (ACP) y análisis discriminante de la carne y grasa de terneros alimentados con dietas enriquecidas en CLA y lino. ....	56
4.1 Muestras carne.....	57
4.2 Muestras grasa.....	59
CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES.....	61
CAPÍTULO VII. BIBLIOGRAFÍA.....	63

## Índice de Tablas

Tabla 1. Composición química de las carnes (según la zona de la canal) y despojos comestibles, correspondiente a la carne de vacuno (en porcentajes). (Hernández Gil, A., 2010). .....	8
Tabla 2. Composición en ácidos grasos de los triglicéridos integrantes de la grasa de las reses de abasto (porcentaje de la cantidad total). (Hernández Gil, A., 2010).....	11
Tabla 3. Ácidos grasos. ....	12
Tabla 4. Aplicación de espectroscopia MIR en productos cárnicos (ternera). ....	32
Tabla 5. Aplicación de la espectroscopia MIR en ácidos grasos. ....	33
Tabla 6. Ingredientes y composición de las dietas experimentales. (P. Alberti <i>et al.</i> , 2013). ....	38
Tabla 7. Efecto de la alimentación enriquecida con CLA y/o lino en los ácidos grasos (mg ácidos grasos/100g de carne) del tejido intramuscular en terneros Holstein (P. Alberti <i>et al.</i> , 2013). ....	39
Tabla 8: Contenido en grasa de las muestras obtenido en la extracción. ....	45
Tabla 9: Asociación de los números de ondas con los grupos funcionales.....	48
Tabla 10: Coeficientes de determinación ( $R^2$ ) y errores cuadráticos medios (RMSECV y RMSEE) para la calibración y validación del modelo de estimación del contenido en ácidos grasos. ....	55
Tabla 11. Porcentaje de variabilidad explicado por los cuatro primeros componentes principales. ....	57
Tabla 12. Resultados de la clasificación de los espectros de carne. ....	58
Tabla 13. Porcentaje de variabilidad explicado por los seis primeros componentes principales. ....	59
Tabla 14. Resultados de la clasificación de los espectros de grasa. ....	59

## Índice de Figuras

Figura 1. Estructura moléculas de los ácidos grasos saturados e insaturados. ....	9
Figura 2. Estructura molecular del glicerol, ácidos grasos y triglicéridos. ....	9
Figura 3. Formula general de los fosfolípidos. ....	10
Figura 4. Estructura molecular de un fosfolípido, su estructura simplificada y su disposición para la formación de membranas celulares. ....	10
Figura 5. Síntesis de la familia de los omega-6 y de los omega-3. ....	14
Figura 6. Digestión de los lípidos en el rumen. Fuente: Gómez, I. (2014). ....	15
Figura 7. Espectro electromagnético (Fuente: Bruker) ....	20
Figura 8. Vibraciones de tensión y flexión. ....	22
Figura 9. Disposición de los elementos en espectroscopia óptica de absorción (Fuente: Willard, H.H. <i>et al.</i> , 1988). ....	23
Figura 10. Esquema interior de un espectrofotómetro basado en la transformada de Fourier (Fuente: Bruker). ....	24
Figura 11. Interferograma de una fuente (derecha) y su espectro correspondiente (izquierda). (Fuente Bruker). ....	24
Figura 12. Accesorio ATR. ....	25
Figura 13. Muestra colocada sobre la placa de reflexión. (Fuente: Bruker). ....	26
Figura 14. Extractor Soxhlet. ....	41
Figura 15. Equipo Bruker Vertex 80v. ....	42
Figura 16. Espectros FTIR de 4 muestras de grasa: control, CLA, lino, L+CLA. ....	47
Figura 17. Espectro FTIR de grasa con los números de onda asociadas. ....	49
Figura 18. Representación de los espectros de carne obtenidos mediante espectroscopia FTIR-MIR. ....	51
Figura 19. Representación de los espectros de grasa obtenidos mediante espectroscopia FTIR-MIR. ....	53
Figura 20. Representación de los espectros de carne y de grasa de un mismo animal. ..	54
Figura 21. Representación de la función discriminante uno y dos. ....	58
Figura 22. Representación de las funciones discriminantes uno y dos. ....	60

## Abreviaturas

AGI: Ácidos grasos insaturados.

AGM: Ácidos grasos monoinsaturados.

AGP: Ácidos grasos poliinsaturados.

AGS: Ácidos grasos saturados.

C: Control.

CLA: Siglas en inglés de ácido linoleico conjugado.

FTIR: Siglas en inglés de transformada de Fourier.

L: Lino.

L+CLA: Dieta enriquecida con lino y ácido linoleico conjugado.

MIR: Siglas en inglés de espectroscopia infrarroja media.

PLS: siglas en inglés de la regresión de mínimos cuadrados parciales.

R<sup>2</sup>: Coeficiente de determinación.



# *RESUMEN*

El objetivo de este trabajo de fin de carrera es la evaluación del perfil de ácidos grasos de la carne de vacuno, con especial atención a los de interés nutricional (ácido linoleico conjugado, CLA por sus siglas en inglés, y lino) en carne y grasa intramuscular de ternero frisón mediante espectroscopia de infrarrojo medio (MIR por sus siglas en inglés).

Para la realización de este trabajo se han empleado muestras de 24 terneros frisonos. Estas muestras se encuentran divididas en grupos de 6 animales en base a la alimentación recibida (alimentación control, enriquecido con CLA, enriquecido con lino y enriquecido con lino y CLA).

Cada muestra se ha sometido a un proceso de picado para conseguir una muestra más homogénea. A continuación se ha realizado la extracción de grasa mediante el proceso de Soxhlet (ISO 1443:1973). Este método se basa en la utilización de un disolvente orgánico, como es el éter, para extraer la grasa de la muestra y posteriormente se evapora el disolvente restante para obtener el peso seco. En este proceso se ha obtenido el porcentaje de grasa intramuscular de cada animal, llegando a la conclusión de que la alimentación enriquecida no influye en el contenido grasa intramuscular.

El análisis de la grasa mediante el espectrofotómetro Vertex 80v (Bruker), proporciona los espectros desde  $4000\text{ cm}^{-1}$  hasta  $400\text{ cm}^{-1}$  mostrando los picos de mayor absorbancia que se basa en las resonancias por vibración de diferentes enlaces químicos. Para la obtención de los espectros se ha utilizado un sistema de reflexión total atenuada (ATR por sus siglas en inglés) que permite una caracterización rápida y con poca preparación de las muestras. Estas medidas espectrales se han analizado con un programa estadístico, que en este caso ha sido el Quant 2, para estudiar la correlación con la composición de los ácidos grasos de las carnes obtenidos mediante la cromatografía gaseosa con el fin de estimar la composición de los ácidos grasos a partir de las medidas obtenidas con el espectrofotómetro MIR. Con las muestras de carne se ha realizado el mismo proceso. Tras este análisis se ha deducido que los espectros de grasa permiten estimar un gran número de ácidos grasos con un porcentaje de fiabilidad superior al 70%. Sin embargo en el caso de los espectros de carne, los coeficientes de determinación son bajos, por lo que no se puede estimar con precisión el contenido en ácidos grasos.

Una vez obtenidos los espectros, y mediante el programa estadístico SPSS, se ha realizado un análisis de componentes principales y un análisis discriminante para ver si es posible agrupar las muestras en base a la alimentación por medio del estudio de los espectros. Como conclusión más importante se observa que utilizando los espectros de grasa es posible clasificar las muestras en función de la alimentación, mientras que los espectros de carne no permiten esta clasificación.

# *CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN*

La demanda de altos niveles de calidad y seguridad en los procesos de producción de alimentos requieren que haya un alto control de los procesos y herramientas analíticas adecuadas tanto en la producción como en la comercialización de los alimentos. Para ello se necesitan técnicas de análisis rápidas, de fácil uso, que no requieran preparación de la muestra y que evite la destrucción de la misma (Karoui, R. *et al.*, 2010).

El contenido en grasa es un parámetro específico de cada animal y es importante ya que de ese contenido dependen las características organolépticas de la carne, por lo que tiene que ser controlado en la producción de carne. Además, también es importante el tipo de grasa que ingerimos, ya que la grasa saturada puede favorecer la aparición de obesidad y de enfermedades cardiovasculares (OMS, 2003).

El análisis del contenido en grasa se puede realizar mediante el empleo de diferentes técnicas, como por ejemplo Soxhlet (1879), el método Babcock (1890), el método Gerber (1891), la cromatografía de gases y el método Bligh & Dyer (1959). No obstante, todos estos métodos presentan inconvenientes, ya que requieren la destrucción de la muestra y su procedimiento es largo y complejo (Wu, D. *et al.*, 2008).

Se han desarrollado nuevos métodos para evaluar el contenido en grasa de diferentes alimentos sin destruir la muestra, como son la espectroscopia en infrarrojo medio (llamado también MIR por sus siglas en inglés, mid-infrared) y en infrarrojo cercano (llamado NIR por sus siglas en inglés, near-infrared). Estos métodos permiten cuantificar el contenido en grasa de una muestra sin destruirla, de una manera simple y fácil (Wu, D. *et al.*, 2008).

En el presente trabajo de fin de carrera se pretende buscar la relación entre la composición de la grasa y la alimentación del vacuno mediante una nueva técnica, el análisis del músculo con espectroscopia MIR.

## *CAPÍTULO II. ANTECEDENTES*

## 1. Características de la carne.

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 de procesos bioquímicos y fisicoquímicos, que se desarrollan como consecuencia del sacrificio del animal. Por otro lado, la canal se considera el cuerpo del animal una vez sacrificado, desangrado y desprovisto de las vísceras torácicas, abdominales y pelvianas, con los riñones, la piel, las patas y la cabeza o sin ellos, dependiendo la especie (Código Alimentario Español, 1967). Las canales están formadas por los tejidos muscular, adiposo y óseo. El tejido muscular, bien solo o bien acompañado parcialmente por el tejido adiposo, da origen a la carne, mientras que el tejido adiposo contribuye a realzar ciertas cualidades de la carne.

### 1.1 Composición química de la carne.

En la composición química de la carne se pueden diferenciar dos clasificaciones, la composición cualitativa y la composición cuantitativa.

#### 1.1.1 Composición química cualitativa.

En la composición química cualitativa intervienen diversas especies químicas que desempeñan un papel en las propiedades de la carne y están relacionadas con la anatomía, fisiología y bioquímica del tejido muscular. Las principales especies químicas implicadas son las proteínas, enzimas, lípidos, agua e hidratos de carbono, citadas según su importancia nutricional.

- a) **Proteínas:** Es el componente químico mayoritario en la fibra muscular. Existen dos grupos que difieren tanto en su localización como en su función: Las intracelulares (17-18%) y las extracelulares (10-15%). No obstante desde el punto de vista cualitativo, en las proteínas intracelulares, cabe distinguir tres grupos: sarcoplásmicas (30-35%), que desempeñan un papel importante en los procesos metabólicos celulares e incluyen enzimas, pigmentos y estructuras integrantes de los orgánulos celulares; miofibrilares, que se encargan de la función contráctil y la reguladora; y proteínas de citoesqueleto (la conectina se considera la proteína principal de este grupo). Las proteínas extracelulares son proteínas insolubles que integran el tejido conectivo.
- b) **Lípidos:** Las canales tienen un elevado porcentaje de compuestos grasos distribuidos en dos grupos: la mayoría forma parte de la grasa de cobertura, susceptible de ser separada, mientras que la minoría forma la grasa intramuscular no separable. Este tejido adiposo está formado por adipocitos dentro de un

entramado de tejido conectivo, formando un conjunto caracterizado por una presencia mayoritaria de lípidos neutros, compuestos en más del 90% de triacilgliceroles, aunque también contiene colesterol y ésteres de colesterol. El porcentaje total de grasa depende de la especie animal y del propio individuo. En el caso de la vaca esta en torno al 2-3,2%. La carne también contiene lípidos polares, en bajos porcentajes, que desempeñan una función estructural. Entre ellos destacan los fosfolípidos. Todos los compuestos grasos se acumulan en la canal en los cuatro depósitos siguientes:

- Cavidades corporales torácica, abdominal y pélvica.
  - Depósito subcutáneo, denominado grasa de cobertura.
  - Grasa intermuscular, separa distintos paquetes musculares.
  - Lípidos intramusculares, grasa depositada en el interior del músculo, en situación muy próxima a los vasos sanguíneos y entre las redes de los tabiques de tejido conectivo perimisial. En la práctica también se conoce como vetado.
- c) Hidratos de carbono del músculo: Suelen constituir el 1-2% de la masa muscular del animal vivo., representado generalmente por el polisacárido glucógeno. Tras el sacrificio se producen cambios muy significativos como consecuencia de la actividad metabólica del tejido muscular.
- d) Elementos minerales: La carne se considera una fuente importante de componentes minerales entre los que destacan el fósforo, yodo, magnesio, cinc, etc., aunque sus cantidades pueden variar con el tipo de alimentación recibida.
- e) Vitaminas: Los productos cárnicos destacan por su contenido en vitaminas del complejo B, en especial tiamina (B1), riboflavina (B2), niacina (B3), etc. En cambio, su contenido en ácido fólico resulta deficiente desde el punto de vista nutricional.
- f) Agua: El nivel de agua en carnes varía entre un 60 y un 80%, dependiendo de la especie, la edad, el sexo y la zona anatómica del tejido. Se diferencian varios tipos de agua:
- Agua ligada o agua de constitución: Forma parte de la carne sin posibilidad de ser extraída, representa un 4-5% del contenido acuoso total.
  - Agua de interfase: Moléculas enlazadas a la superficie de las proteínas mediante una energía de unión superior a la propia del agua normal.
  - Agua inmovilizada: Su magnitud depende de la potencia de la fuerza que físicamente se ejerce sobre el músculo.
  - Agua libre: Corresponde a las moléculas de agua que se mantiene en el músculo retenidas solamente por las fuerzas superficiales.

### 1.1.2 Composición química cuantitativa.

La composición del musculo es muy variable tanto entre individuos como entre las diferentes zonas dentro del animal. Los parámetros más relevantes son la humedad, proteína, lípidos y cenizas. Tal y como se ha comentado anteriormente estos valores son muy variable entre especies, individuos y zonas de la canal de un mismo animal. En la siguiente tabla (1) se muestra en porcentaje la composición del musculo en diferentes zonas de una canal de vacuno.

Tabla 1. Composición química de las carnes (según la zona de la canal) y despojos comestibles, correspondiente a la carne de vacuno (en porcentajes). (Hernández Gil, A., 2010).

VACUNO	Humedad	Proteína	Lípidos	Ceniza
<b>Lomo</b>	67,6	20,8	9,8	1,0
<b>Solomillo</b>	73,1	21,2	4,0	1,2
<b>Pierna</b>	71,2	21,2	7,2	1,0
<b>Costillar</b>	58,7	19,2	20,3	0,9
<b>Espalda</b>	69,5	29,8	9,3	1,0
<b>Hígado</b>	69,9	19,7	3,1	1,4
<b>Riñones</b>	76,1	16,6	5,1	5,1
<b>Corazón</b>	75,5	16,8	6,0	6,0
<b>Lengua</b>	66,8	16,0	15,9	15,9

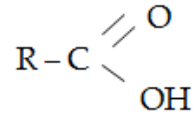
### 1.2 **Composición lipídica.**

Reciben el nombre de lípidos aquellas sustancias de origen biológico, solubles en los llamados disolventes orgánicos apolares como hexano, tolueno, benceno o cloroformo e insolubles en agua. Esta definición incluye algunos compuestos de naturaleza química diversa. El factor comun de este grupo de moléculas es la presencia de cadenas relativamente largas de átomos de carbono, con una composición en la que predominan el C y el H. Estas características son las que determinan el grado de apolaridad y poseen por ello las propiedades de solubilidad que las caracteriza.

Una de las funciones más importantes de los lípidos se relaciona con el hecho de que en presencia de agua se asocian formando capas, sirviendo de base para la organización de la estructura de las membranas celulares. Otros tipos de lípidos representan grandes reservas energéticas. Esto se debe a que la grasa se puede almacenar en grandes cantidades y porque tiene un alto valor calórico. En los organismos superiores la grasa se acumula principalmente debajo de la piel. Cabe recordar que algunas hormonas y vitaminas pertenecen al grupo de los lípidos.



Los lípidos suelen contener cadenas apolares de átomos de carbono, más o menos largas, formadas en muchos casos por ácidos grasos. Éstos son ácidos alifáticos monocarboxílicos que presentan la siguiente estructura:



donde R representa una cadena de átomos de carbono e hidrógeno más o menos compleja. Todos los ácidos grasos tienen un grupo carboxilo por lo que se distinguen por la cadena de átomos de carbono y por la presencia o no de doble enlaces. Los ácidos grasos más comunes entre los lípidos son los que presentan cadenas de 16 o 18 átomos de carbonos. Los dobles enlaces entre átomos de carbono determinan si el ácido graso es saturado, no presentan dobles enlaces, o insaturado, presentan al menos un doble enlace.

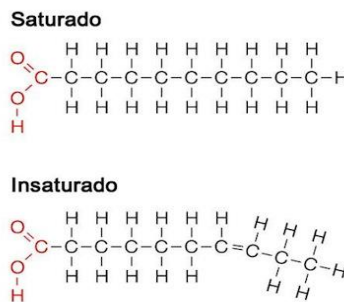


Figura 1. Estructura moléculas de los ácidos grasos saturados e insaturados.

Los dobles enlaces de ácidos grasos insaturados que existen en la naturaleza son muy a menudo de orientación cis. Una configuración cis significa que los átomos de hidrógeno unidos a los dobles enlaces se encuentran en el mismo plano. Si los átomos de hidrógeno se encuentran en los planos opuestos, la configuración se denomina trans (FAO (Adaptado de: Fahy *et al.*, 2005)).

Las grasas que aparecen en los animales son principalmente mezclas de triglicéridos o grasas neutras.

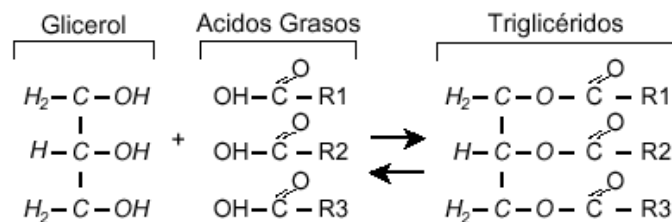


Figura 2. Estructura molecular del glicerol, ácidos grasos y triglicéridos.

Los triglicéridos se distinguen según la identidad y el lugar de sus tres residuos de ácidos grasos. Los triglicéridos simples contienen un solo tipo de residuo de ácido graso, sin embargo los triglicéridos mixtos contienen dos o tres residuos de ácidos grasos.

En los depósitos grasos también se encuentran los fosfolípidos o fosfoglicéridos en pequeñas cantidades. Estos elementos forman las membranas celulares debido a su naturaleza anfipática. Su estructura es semejante a la de las grasas neutras, ya que están formados por una molécula de glicerol y moléculas de ácidos grasos esterificadas (Figura 3). En la posición del tercer ácido graso se encuentra una molécula de ácido fosfórico unida a una molécula orgánica mediante un enlace tipo éster.

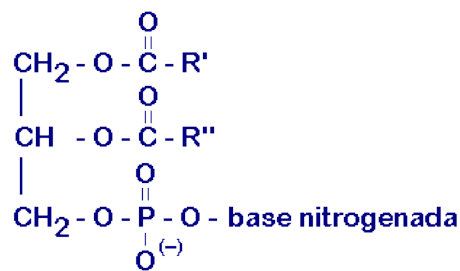


Figura 3. Fórmula general de los fosfolípidos.

El ácido graso, el glicerol y el ácido fosfórico forman la porción llamada ácido fosfatídico.

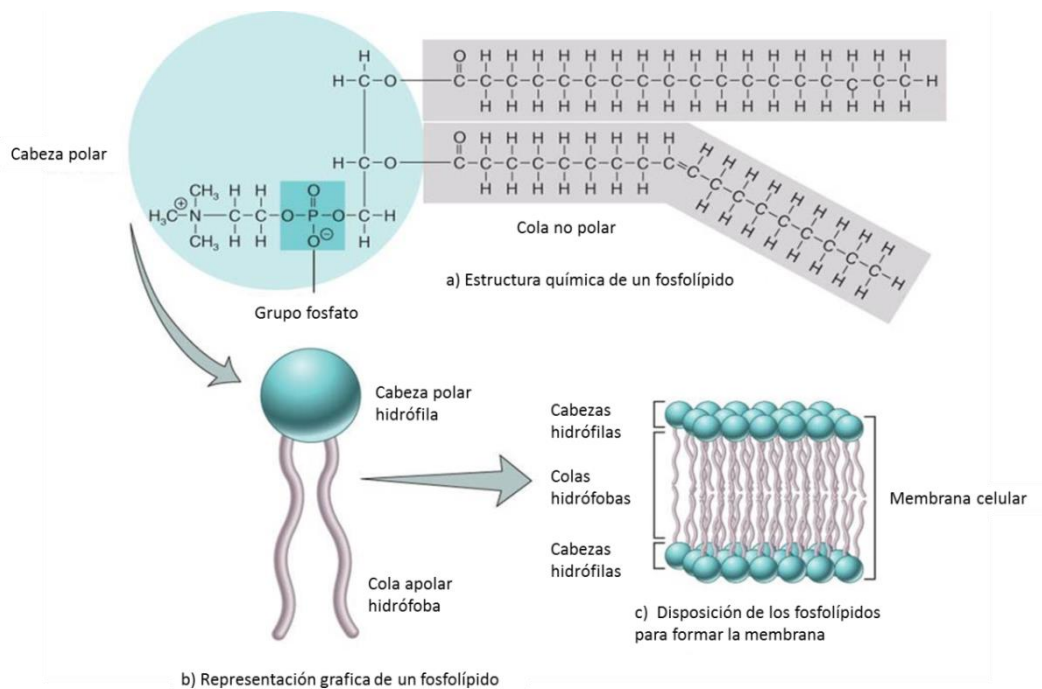


Figura 4. Estructura molecular de un fosfolípido, su estructura simplificada y su disposición para la formación de membranas celulares.

Los fosfolípidos son formaciones anfipáticas debido a que tiene una zona polar, constituida por glicerol, el ácido fosfórico y la molécula orgánica, y una zona apolar, formada por las cadenas de átomos de carbono (Figura 4). La zona polar es atraída por el agua mientras que la zona apolar no, de tal modo que se unen las porciones apolares para crear estructuras denominadas bicapa.

Los lípidos son el parámetro que representa mayor variabilidad, tanto en calidad como en cantidad y su nivel depende de la relación grasa-agua, aunque su principal factor de variación radica en la especie animal, raza, edad y sexo. La carne de vacuno presenta cierta cantidad de grasa intramuscular que le proporciona jugosidad apropiada, aunque dicha grasa se caracteriza por el alto contenido en ácidos grasos saturados. Además, los animales jóvenes retienen más grasa debajo de la piel, mientras que los animales de más edad la retienen dentro de las fibras musculares.

La composición en ácidos grasos de los triglicéridos varía dentro de las diferentes especies animales. A continuación se muestra una tabla (2) con los porcentajes de las reses de abasto.

Tabla 2. Composición en ácidos grasos de los triglicéridos integrantes de la grasa de las reses de abasto (porcentaje de la cantidad total). (Hernández Gil, A., 2010).

Ácidos grasos	Cerdo	Tenera	Cordero	Pollo
Mirístico (C14:0)	1,9	3,3	2,7	0,5
Palmítico (C16:0)	23,7	25,8	24,7	22,6
Palmitoleico (C16:1)	3,2	7,9	2,1	4,3
Estearico (C18:0)	12,5	10,1	28,3	8,0
Oleico (C18:1)	38,0	42,9	36,8	26,5
Linoleico (C18:2)	12,8	2,4	5,7	22,3
Linolénico (C18:3)	1,2	1,8	1,5	0,9
Araquidónico (C20:4)	0,3	<0,1	0,6	4,1

### 1.3 Ácidos grasos.

Por lo general, en la carne predominan los ácidos grasos con número par de átomos de carbono (desde 4 hasta 24), que corresponden a los tres tipos siguientes:

- Saturados, como mirístico (C14:0), palmítico (C16:0) o estearico (C18:0).
- Monoinsaturados, como oleico (C18:1) y palmitoleico (C16:1).
- Poliinsaturados, como linoleico (C18:2), linolénico (C18:3) y araquidónico (C20:4).

A continuación se muestra una tabla (3), con los nombres y estructuras de los ácidos grasos más importantes.

Tabla 3. Ácidos grasos.

	Uniones dobles	Nombre común	AG	Estructura
<b>Saturados</b>	-	Butírico	C4:0	CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -COOH
	-	Caproico	C6:0	CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -COOH
	-	Caprílico	C8:0	CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> -COOH
	-	Cáprico	C10:0	CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>8</sub> -COOH
	-	Láurico	C12:0	CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>10</sub> -COOH
	-	Mirístico	C14:0	CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>12</sub> -COOH
	-	Palmítico	C16:0	CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>14</sub> -COOH
	-	Estearico	C18:0	CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>16</sub> -COOH
	-	Aráquico	C20:0	CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>18</sub> -COOH
	-	Behénico	C22:0	CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>20</sub> -COOH
-	Lignocérico	C24:0	CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>22</sub> -COOH	
<b>Monoinsaturados</b>	n-6	Palmitoleico	C16:1	CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> -CH=CH- (CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> -COOH
	n-9	Oleico	C18:1	CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> -CH=CH- (CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> -COOH
	n-9	Eicosenoico	C20:1	CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> -CH=CH- (CH <sub>2</sub> ) <sub>9</sub> -COOH
	n-9	Erúxico	C22:1	CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> -CH=CH- (CH <sub>2</sub> ) <sub>11</sub> -COOH
<b>Poliinsaturados</b>	n-6	Linoleico	C18:2	CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> - CH=CH) <sub>2</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> - COOH
	n-6	Gamma-linolénico	C18:3	CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> - CH=CH) <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> - COOH
	n-6	Araquidónico	C20:4	CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> - CH=CH) <sub>4</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> - COOH
	n-3	Alfa- linolénico (ALA)	C18:3	CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> -CH=CH) <sub>3</sub> - (CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> -COOH
	n-3	Ácido eicosapentanoico (EPA)	C20:5	CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> -CH=CH) <sub>5</sub> - (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -COOH
	n-3	Docosapentanoico	C22:5	CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> -CH=CH) <sub>5</sub> - (CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> -COOH
	n-3	Ácido docosahexanoico (DHA)	C22:6	CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> -CH=CH) <sub>6</sub> - (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -COOH

### 1.3.1 Ácidos grasos de interés nutricional.

El contenido graso es uno de los factores que afectan a la calidad de la carne debido a que repercuten en las propiedades tecnológicas de las carnes destinadas a la elaboración de derivados. Sobre todo en curados, dado que tanto la grasa intermuscular como la intramuscular determinan el grado de deshidratación que se da durante el proceso de curación. También es importante desde el punto de vista de la calidad nutricional, ya que está determina el aporte cualitativo y cuantitativo de nutrientes que contribuyen a la dieta alimenticia.

Los ácidos grasos que mayor interés nutricional tienen son los ácidos grasos esenciales. Se denominan ácidos grasos esenciales a aquellos ácidos grasos que el cuerpo no puede fabricar y que son ingeridos a través de alimentos o suplementos. Existen dos grupos de ácidos grasos esenciales, los omega-3 (Ácido linolénico) y los omega-6 (Ácido linoleico).

Estos ácidos grasos pertenecen al grupo de ácidos grasos poliinsaturados. Es decir, presentan más de un enlace doble y en posición cis.

- Omega-3: Estos ácidos grasos se caracterizan por tener el primer enlace doble entre las 3<sup>o</sup> y 4<sup>o</sup> carbono, comenzando por el extremo donde se encuentra el grupo metilo (CH<sub>3</sub>). El precursor de este tipo de ácidos grasos es el ácido alfa-linolénico (ALA), por eso se considera el ácido graso esencial primario o generador de la familia n-3. En el organismo, este ácido graso se convierte en ácido eicosapentanoico (EPA) y en ácido docosahexanoico (DHA). El ALA se encuentra principalmente en el aceite de soja, mientras que los EPA y DHA se encuentran en la grasa de pescados.
- Omega-6: En este caso el primer enlace doble se encuentra entre el 6<sup>o</sup> y 7<sup>o</sup> carbono de la cadena, comenzando por la esquina donde se encuentra el grupo metilo (CH<sub>3</sub>). El precursor de este grupo es el ácido linoleico a partir del cual se obtiene los ácidos grasos omega-6. Este ácido graso se encuentra en los aceites semillas vegetales.

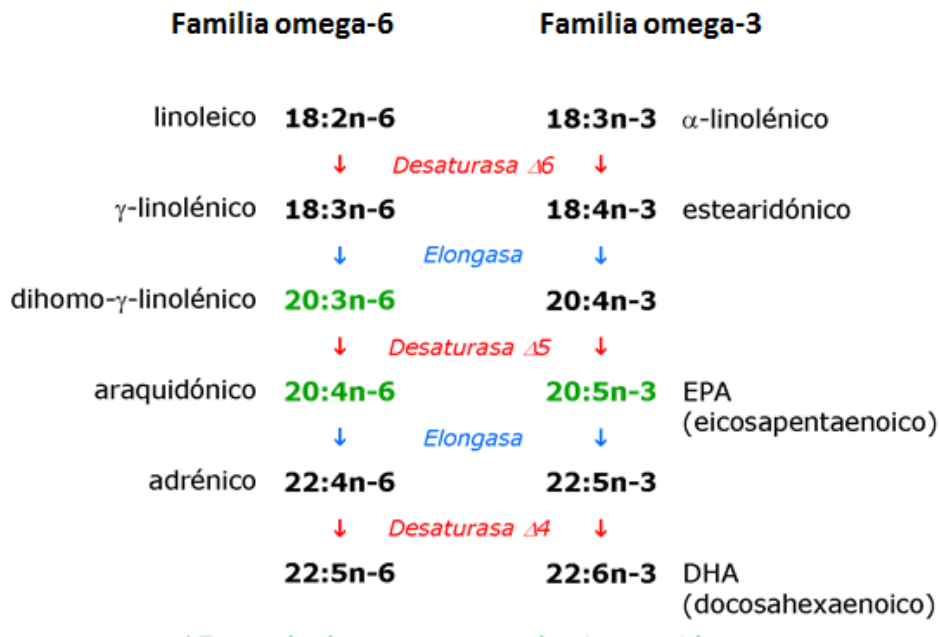


Figura 5. Síntesis de la familia de los omega-6 y de los omega-3.

### 1.3.2 Rutas metabólicas de los ácidos grasos.

Los alimentos de los rumiantes se basan en forrajes ricos en fibras y compuestos almidonados. Estos alimentos están formados por agua y materia orgánica, como por ejemplo lípidos, proteínas y carbohidratos. Estos nutrientes no pueden ser empleados por los rumiantes directamente.

La digestión de los alimentos comienza con el proceso de rumia donde se reducen a partículas de menor tamaño. En el metabolismo de los rumiantes, los alimentos sufren una fermentación microbiana. Los lípidos son hidrolizados por las lipasas microbianas para que los ácidos grasos insaturados (AGI) libres sean biohidrogenados y puedan ser absorbidos en el intestino. Este proceso se muestra en la figura 6.

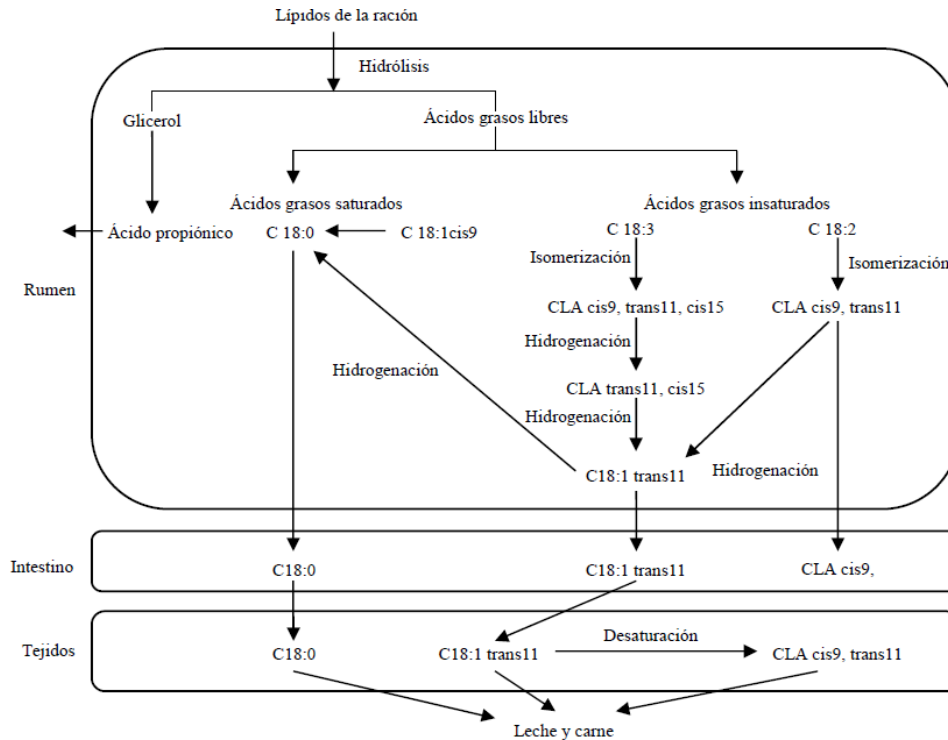


Figura 6. Digestión de los lípidos en el rumen. Fuente: Gómez, I. (2014).

Nota: C18:0, ácido esteárico; C18:1, ácido oleico; C18:1 trans11, ácido *trans*-vaccénico; C18:2, ácido linoleico; C18:2 cis9, trans11, ácido ruménico; C18:3, ácido linoléico.

En el rumen la lipólisis de los lípidos se produce mediante la acción de enzimas microbianas y diferentes especies de protozoos y hongos. La velocidad de las lipólisis depende del contenido en almidón de la dieta y de la fuente de grasa, siendo en las grasas puras más rápida.

La biohidrogenación de los AGI liberados se lleva a cabo por los microorganismos ruminales, dando lugar a los isómeros *trans* y ácidos grasos saturados (AGS). En este proceso el hidrogeno se introduce en los enlaces dobles para obtener AGS. Este proceso ocurre en el 70-90% de los ácidos grasos.

En el caso de los ácidos grasos poliinsaturados, solo entre el 10-15% logran no ser biohidrogenados. Este porcentaje depende de la cantidad de poliinsaturados que llegan al rumen, cuantos más ácidos grasos insaturados hay menor será la proporción de biohidrogenación, y del pH ruminal, ya que a menos pH hay menos bacterias encargadas de la biohidrogenación.

Los ácidos grasos con cadenas de menos de 12 carbonos son vertidos a la vena porta y transportados al hígado unidos a la albúmina sérica. Los ácidos grasos que llegan al intestino son esterificados e incorporados a lipoproteínas de baja densidad y

quilomicrones para ser transportados por vía linfática hasta el torrente sanguíneo y distribuirlos a los tejidos.

Los ácidos grasos pueden tener diferentes usos o destinos. Principalmente están asociados al metabolismo energético en el animal, por lo que son sintetizados y depositados (lipogénesis) o degradado (lipolisis) en función del balance energético del animal. La lipogénesis ocurre ante un balance energético positivo, mientras que la lipolisis ocurre ante un balance energético negativo. Además los ácidos grasos también tienen una función estructural, como los fosfolípidos de membrana.

El desarrollo de los depósitos adiposos en vacuno sigue un orden temporal. En primer lugar se desarrolla la grasa abdominal, luego la intermuscular y subcutánea, y finalmente la intramuscular. La adición de lípidos en la dietas de rumiantes en cebo incrementa la proporción de grasa en la canal.

En este proyecto se van a intentar cuantificar algunos de estos ácidos grasos. Además para enriquecer la dieta de los animales se ha empleado ácido linoleico conjugado (CLA) y lino. El CLA es un grupo de isómeros que provienen del ácido linoleico. En este proyecto se va a intentar cuantificar el CLA 9c11t, de interés nutricional por su efecto anticancerígeno y antiinflamatorio, y el CLA 10t12c, de interés por ayudar a reducir la grasa corporal. En cuanto al lino, es una fuente vegetal rica en ácidos omega-3 y ayudo a reducir el colesterol, regula la presión y favorece la función arterial.

## **2. Métodos de medida de la composición química.**

Tal y como se ha comentado anteriormente, 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 el siguiente apartado se van a explicar de forma breve los métodos más usados para determinar la composición lipídica.

### **2.1 Composición lipídica.**

Este tipo de análisis no determina sólo el contenido real en grasa, sino la fracción lipídica que contienen los alimentos, la cual incluye grasa y sustancias como los fosfolípidos, los esteroides, los terpenos o las vitaminas solubles en grasa. Pese a que incluye más componentes, la grasa supone el 99% de la fracción lipídica de los alimentos.



Existen diversos métodos de estimación del contenido en grasa que se pueden clasificar en procedimientos de extracción y procedimientos volumétricos.

### 2.1.1 Procedimientos de extracción.

Estos procedimientos implican la extracción de la grasa de los alimentos con la mínima exposición al calor y a la luz. Para ello se usa disolvente que posteriormente debe ser eliminado para poder valorar el residuo. Los más comunes son el hexano, dietil éter y el éter de petróleo. Los resultados de este método dependen de la grasa libre que contenga el alimento, la polaridad del disolvente y de los procedimientos realizados para extraer la grasa. A continuación, se presentan algunos de los métodos existentes para la extracción de grasa.

La extracción Soxhlet (1879) (ISO-1443; Método de Análisis de Productos Cárnicos (BOE 29/879)) consiste en la extracción mediante un disolvente orgánico no polar. Para ello se coloca una cantidad conocida de muestra en un cartucho poroso que se introduce en la cámara de extracción donde la muestra entrará en contacto con el disolvente. La cámara de extracción está conectada por la parte inferior con un matraz seco, y de peso conocido, donde se colocará el disolvente, mientras que por la parte superior se encuentra conectada a una zona de refrigeración. El proceso de extracción comienza con el calentamiento del matraz, de tal manera que el disolvente se evapora hasta llegar a la zona de refrigeración donde se condensa en el serpentín de refrigeración y cae sobre la cámara de extracción, donde se encuentra la muestra. El disolvente arrastra la grasa disuelta hasta el matraz y el proceso se repite continuamente hasta que se asume que toda la grasa ha sido extraída y se encuentra en el matraz. Tras la extracción de la grasa se procede a eliminar el solvente por evaporación, para ello se deja evaporar de modo que en el matraz solo queda la grasa como residuo. El matraz se volverá a pesar y la diferencia de peso con respecto al peso del matraz seco será la cantidad grasa presente en la muestra. En algunos alimentos, como es la carne, la grasa puede encontrarse unida a otras sustancias por lo que puede ser necesario un tratamiento previo con ácido clorhídrico para romper estas uniones.

El método de Bligh y Dyer (1959) consiste en la homogeneización de las muestras con metanos y cloroformo en proporción 2:1 para favorecer la extracción de la grasa. Además, al añadir el cloroformo se obtiene la separación de fases. Los disolventes son separados por centrifugación siendo la capa de cloroformo la que contiene la grasa disuelta. Al eliminar el disolvente se podrá obtener el peso de grasa que contiene la muestra. Este método se desarrolló como modificación del método de Folch *et al.* (1957) en el que las proporciones de disolvente eran diferentes. Tras la extracción los compuestos no lipídicos son eliminados ajustando la proporción entre cloroformo,

metanol y agua a 8:4:3, respectivamente. El resto del proceso es igual que el explicado para el método de Bligh y Dyer.

El método de Werner- Schmid o Schmid-Bondzynski-Ratzlaff (ISO 1735:2004) consiste en tratar la muestra con ácido clorhídrico caliente para romper los enlaces con grasa y proteínas. Tras este proceso se realiza la extracción de grasa con dietil éter o una mezcla de dietil éter y éter de petróleo. Una vez extraída la grasa se elimina el disolvente de tal manera que se puede cuantificar la grasa presente en la muestra mediante una pesada. Este método no es adecuado para alimentos que contengan azúcar ya que se puede producir la caramelización del mismo durante el calentamiento.

En el método de Weibull-Stoldt (ISO 1444:1996) y Weibull-Berntrop (ISO 8262 3:2005) la muestra es previamente digerida mediante ácido clorhídrico caliente, como en el método anterior, pero el residuo obtenido es filtrado mediante un papel de filtro y tras su secado, es colocado en un aparato de extracción tipo Soxhlet. Al residuo se le aplica disolventes como el dietil éter o el éter de petróleo, siendo el resto del procedimiento igual que el método Soxhlet.

Los métodos Mojonier (1925) y Rose-Gottlieb (ISO 1737:2008) son métodos similares en sus procedimientos pero emplean diferentes equipos. En comparación con el resto de métodos antes explicados, en este método la digestión se realiza con amonio en vez de con ácido. Después, la grasa es extraída con disolventes similares a los usados en otros métodos, con la adición de etanol para evitar la formación de emulsiones. Los disolventes son eliminados y se procede al pesado del residuo graso.

### 2.1.2 Procedimientos volumétricos.

En este tipo de procedimientos la digestión de la muestra se realiza con ácido sulfúrico concentrado en un recipiente especialmente diseñado para realizar este método y que viene calibrado con una escala. La mezcla se centrifuga para obtener la separación de la fase acuosa y la grasa, y después se deja que alcance una determinada temperatura. La medida de la cantidad de grasa se realiza con la lectura de la escala que tiene el recipiente. Existen dos métodos ampliamente utilizados, el método de Babcock y el método Gerber.

El método Gerber (Gerber, N. 1891) se utiliza principalmente en Europa y Reino Unido. Para este método fueron diseñados unos tubos específicos llamados de Gerber o butirómetros. Este proceso comienza con la medida de una cantidad específica de grasa que se introduce en el butirómetro, a continuación se le añade ácido sulfúrico concentrado, para realizar la digestión, y alcohol amílico que facilita la separación de la

grasa y la fase acuosa. También se le puede añadir agua para elevar el nivel de los de la mezcla hasta que la muestra de grasa se posicione dentro de la escala calibrada del tubo de Gerber. La adición del ácido hace que la temperatura de la mezcla se eleve produciendo la conversión de estado sólido a líquido de la grasa. En ocasiones es necesario colocar el butirómetro en un baño de agua caliente para favorecer el ascenso de la temperatura y la licuefacción de la grasa. A continuación la mezcla es centrifugada, en una centrifuga especial para este experimento, a 1100 rpm. Tras este paso, los tubos son colocados en baños a 65°C para esterilizarlos. Una vez esterilizados se procede a realizar la lectura. El método Babcock (1890) es similar al método Gerber, diferenciándose en que los recipientes empleados tiene un diseño diferente, se llama matraz Babcock, y la escala es diferente. Este método es más usado en Estados Unidos.

### 2.1.3 Cromatografía gaseosa.

La cromatografía gas-líquido se basa en la distribución del analito entre una fase móvil gaseosa y fase líquida inmovilizada sobre la superficie de un sólido inerte. La muestra se volatiliza y se inyecta en la cabeza de una columna cromatográfica donde se produce la elución por el flujo de una fase móvil de un gas inerte. La fase móvil no interacciona con las moléculas del analito, solo lo trasporta a través de la columna. Esta técnica es la más empleada y tiene aplicación en todos los campos de la ciencia. Normalmente se abrevia como cromatografía de gases (CG). El primer aparato comercial apareció en 1955.

Con esta técnica se obtienen los cromatogramas, que sería equivalente al espectro obtenido mediante la espectroscopia infrarroja. De esta manera se puede estimar el contenido en ácidos grasos en grasa, entre otras aplicaciones (Skoog, D. *et al.*, 2001).

### 3. Espectroscopia de infrarrojo.

La espectroscopia es un método analítico que trata de obtener información de la interacción de la radiación electromagnética con la muestra. Cada onda electromagnética está caracterizada por el valor de su frecuencia ( $\nu$ ) y su longitud de onda ( $\lambda$ ). Otra características de las ondas el número de onda que es el inverso a la longitud de onda. Estos valores componen el espectro electromagnético, que se puede dividir en rayos gamma, rayos X, luz ultravioleta, luz visible, luz infrarroja, microondas, onda corta y ondas de radio (Figura 7).

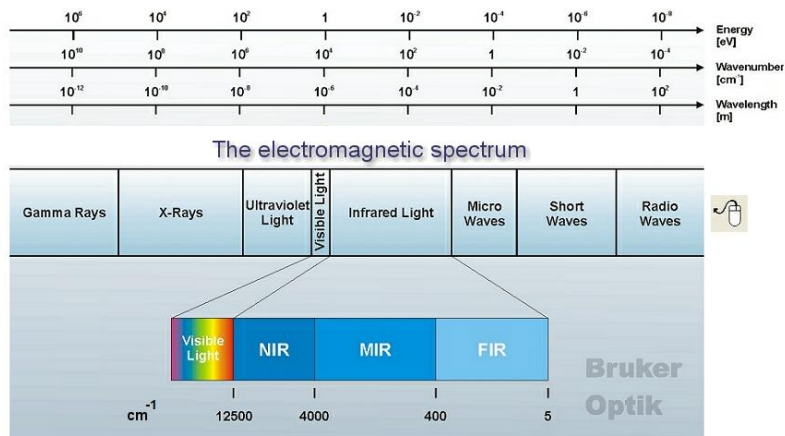


Figura 7. Espectro electromagnético (Fuente: Bruker)

La región del infrarrojo del espectro comprende la radiación con números de onda entre 12.500 y 10 cm<sup>-1</sup>, que corresponden a longitudes de onda de 0,8 a 1.000 μm. Tanto desde el punto de vista de los aparatos como de las aplicaciones el espectro infrarrojo puede dividirse en tres zonas denominadas infrarrojo cercano (12.500-4.000 cm<sup>-1</sup>), medio (4.000-400 cm<sup>-1</sup>) y lejano (400-5 cm<sup>-1</sup>), siendo en el MIR donde se dan la mayoría de las aplicaciones analíticas tradicionales.

Dependiendo de en qué región del espectro infrarrojo se vaya a trabajar, las técnicas y las aplicaciones difieren considerablemente. Las medidas en la región del infrarrojo cercano se realizan con fotómetros y espectrofotómetros similares, en cuanto a diseño y componentes, a los instrumentos utilizados en la espectroscopia ultravioleta y visible. Además a partir de la década de los 80 del pasado siglo el NIR ha sufrido un gran cambio. Las aplicaciones más importantes de esta región espectral se sitúan en los procesos de control y en el análisis cuantitativo de materiales industriales y agrícolas.

En cuanto al IR lejano requiere el uso de fuentes y materiales ópticos especiales. Es utilizado para el análisis de compuestos orgánicos, inorgánicos u organometálicos que contengan átomos pesados (masa atómica superior a 19) y proporciona información útil en estudios estructurales.

Con lo que respecta a la región del infrarrojo medio, hasta principios de los años 80, los instrumentos eran en su mayoría de tipo dispersivo, contando con la presencia de redes de difracción. Sin embargo, a partir de ese momento, tuvo lugar un cambio espectacular en la instrumentación del infrarrojo medio al incorporar el método de la transformada de Fourier, ya que permite obtener espectros de mayor calidad y minimiza el tiempo de obtención de datos. La creación de este tipo de espectrómetros y su, relativamente, bajo coste ha hecho que aumente el número y tipo de aplicaciones de la radiación infrarroja. La razón por la que se ha dado este incremento se debe al

aumento de la relación señal/ruido, es decir a la disminución del ruido, y al aumento de los límites de detección.

Anteriormente a la aparición de estos instrumentos, esta región de infrarrojo medio se empleaba para el análisis orgánico cualitativo y para determinar estructuras, en base a los espectros de absorción. Actualmente se está comenzando a emplear en el análisis cualitativo por medio de la espectroscopia de emisión y de absorción. El uso de la región del infrarrojo lejano ha estado limitado por dificultades experimentales, debido a que hay pocas fuentes de este tipo de radiación y son débiles. Los espectrómetros basados en la transformada de Fourier, presentan un rendimiento mayor por lo que hace que la región espectral del infrarrojo lejano sea más accesible.

### **3.1 Fundamento.**

Los espectros de las especies moleculares obtenidas en el infrarrojo son el resultado de los cambios energéticos que se dan en el paso de unos estados de energía vibracionales y rotacionales a otros, donde existen diferencias de energía. Estas transiciones hacen que haya un cambio neto en el momento dipolar de la molécula afectada provocando que el campo eléctrico alterno de la radiación interactúe con la molécula y cambie la amplitud de sus movimientos. Por eso las especies que no pueden sufrir cambios netos durante la rotación o la vibración, no son capaces de absorber en infrarrojo.

La frecuencia con la que se dan estos cambios depende de la naturaleza de los enlaces que hay dentro de la molécula y de los tipos funcionales que se asocian con la oscilación.

Los dos tipos de vibraciones que se pueden diferenciar con las vibraciones de tensión y de flexión. La vibración de tensión se basa en el cambio de la distancia interatómica en el eje de los enlaces entre dos átomos, donde se puede producir la extensión o contracción del mismo. Las vibraciones de flexión se basan en el cambio en el ángulo entre dos enlaces, pudiendo ser de cuatro tipos: balanceo, aleteo, tijereteo y torsión (Figura 8).

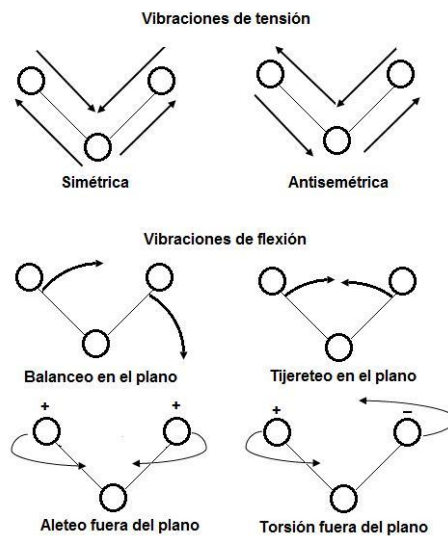


Figura 8. Vibraciones de tensión y flexión.

En moléculas que contiene más de dos átomos, son posibles todos los tipo de vibraciones, incluso pueden producirse interacciones de las vibraciones de los enlaces con un mismo átomo. Esta interacción hace que los picos cambien y que no se vea lo que se esperaba. Esto se puede explicar por medio de los siguientes factores:

1. La simetría de las moléculas es tal que hace que no haya cambio de dipolo debido a las oscilaciones moleculares posibles.
2. Si una molécula presenta dos o más vibraciones distintas y de energía parecida, los picos pueden fundirse y aparecer como uno solo.
3. Si una vibración molecular produce una absorbancia muy pequeña puede que no sea detectada.

### 3.2 Instrumentación.

Para las medidas de absorción en el infrarrojo existen dos tipos de instrumentos, los instrumentos basados en la transformada de Fourier y los espectrofotómetros dispersivos de red.

#### 3.2.1 Espectrofotómetros dispersivos de red.

Este tipo se instrumentos va a ser comentado brevemente, ya que para este proyecto se ha empleado un instrumento basado en la transformada de Fourier.

El espectrofotómetro dispersivo de red está formado por cinco componentes: (1) fuente estable de energía radiante; (2) selector de onda; (3) recipiente para la colocación de la muestra; (4) detector de radiación o transductor que convierte la energía radiante en señal útil, generalmente eléctrica; y (5) dispositivo para el procesamiento de la señal y de la lectura. El orden de los elementos varía según el tipo de espectroscopia, en la

siguiente figura se muestra la disposición para una aplicación de espectroscopia de absorción en el infrarrojo.

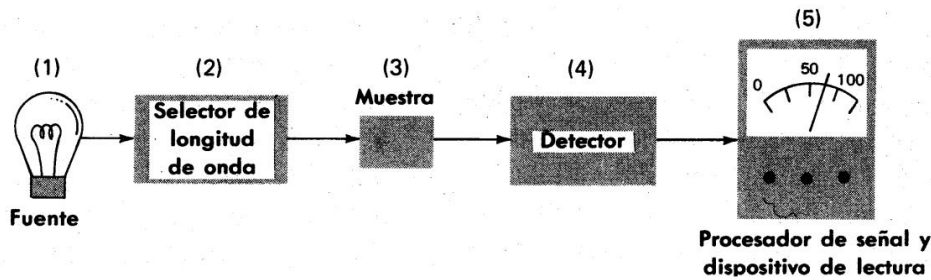


Figura 9. Disposición de los elementos en espectroscopia óptica de absorción (Fuente: Willard, H.H. *et al.*, 1988).

Este tipo de instrumentos se emplea para el análisis cualitativo. Son espectrofotómetros de doble haz, es decir, la radiación procedente de la fuente se divide en dos haces, uno que se dirige a la celda que contiene la muestra y el otro a la celda de referencia. El haz de referencia pasa por un atenuador y se dirige al divisor periódico (cortador) que deja pasar de forma alternativa el haz procedente de la muestra y de la referencia. Seguidamente se produce la dispersión de la radiación y llega alternativamente al detector, dando lugar a una señal eléctrica. Esta señal es amplificada antes de llegar al rectificador. Si los dos haces son iguales en potencia la señal del rectificador es una señal continua, y si los dos haces tienen diferente potencia se produce una corriente alterna. Posteriormente se filtra la señal del rectificador y se amplifica antes de ser registrada.

### 3.2.2 Instrumentos basados en la transformada de Fourier.

Hasta los años 80 los instrumentos más empleados fueron los espectrofotómetros dispersivos. Sin embargo, en la actualidad los más empleados son los espectrómetros basados en la transformada de Fourier, debido a que son más rápidos, fiables y cómodos. Además, estos instrumentos presentan relación señal/ruido mayor que la de los dispersivos, también presentan una mayor resolución, más exactitud y reproducibilidad, lo que posibilita el análisis de espectros complejos.

La mayor parte de los instrumentos que emplean la transformada de Fourier se basan en el interferómetro de Michelson. Estos equipos tienen un espejo móvil, uno fijo y un divisor de haz, entre otros elementos (Figura 10). La radiación que proviene de la fuente incide sobre un espejo que hace que los rayos se vuelvan paralelos y el haz resultante es dividido en dos por el divisor de haz. La primera mitad pasa al espejo fijo y la segunda mitad al espejo móvil.

Tras la reflexión, los dos haces se vuelven a juntar en un haz de salida que atraviesa la muestra y llega al detector.

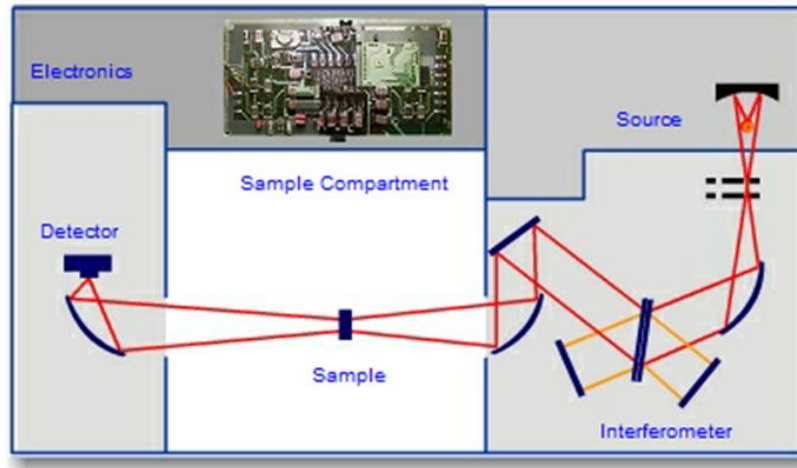


Figura 10. Esquema interior de un espectrofotómetro basado en la transformada de Fourier (Fuente: Bruker).

A la salida del interferómetro se obtiene una señal denominada interferograma. Esta señal es la resultante de las interferencias entre los haces reflejados en los espejos fijo y móvil para cada longitud de onda de la luz proporcionada por la fuente. Si la diferencia de caminos entre ambos haces coincide con el número entero de longitud de onda, se produce una interferencia constructiva. Sin embargo, si no coincide, se produce una interferencia destructiva. El interferómetro es un modulador de señal, y el interferograma porta la información de las muestras, es decir muestras la radiación que no ha sido absorbida por la muestra. La función de la transformada de Fourier es transformar la información del interferograma en los espectros. En la siguiente figura se muestra un interferograma y su correspondiente espectro.

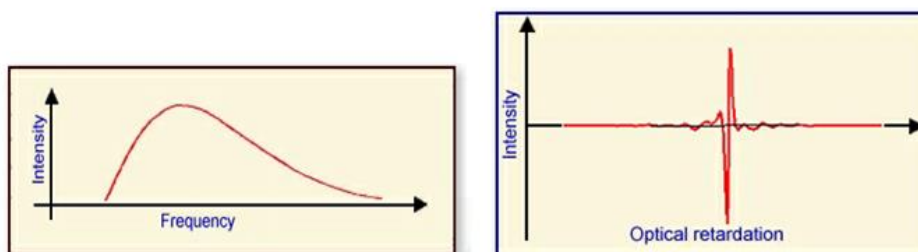


Figura 11. Interferograma de una fuente (derecha) y su espectro correspondiente (izquierda). (Fuente Bruker).



Una de las técnicas más empleadas en los instrumentos basados en la transformada de Fourier es la reflectancia total atenuada (ATR).



Figura 12. Accesorio ATR.

La espectroscopia de reflexión total interna es una técnica que permite la obtención de espectros de infrarrojo de una muestra que presenta alguna dificultad, como sólidos de limitada solubilidad, películas, fibras, pastas, adhesivos y polvos.

Cuando un haz de radiación pasa de un medio más denso a uno menos denso, se produce una reflexión. La fracción del haz incidente que se refleja es mayor a medida que aumenta el ángulo de incidencia, hasta cierto ángulo crítico, a partir del cual la reflexión es completa. Durante la reflexión el haz penetra en el medio menos denso antes de la reflexión. A esa radiación se le denomina onda evanescente. Si el medio menos denso absorbe la radiación evanescente, se produce una atenuación del haz en las longitudes de onda de las bandas de absorbancia. A este fenómeno se le denomina reflectancia total atenuada (ATR) (Skoog, D. *et al.*, 2001).

La muestra se coloca sobre un material con un alto índice de refracción. Ajustando el ángulo incidente, la radiación experimenta múltiples reflexiones internas antes de pasar al detector. En cada una de las reflexiones tiene lugar la absorbancia y la atenuación.

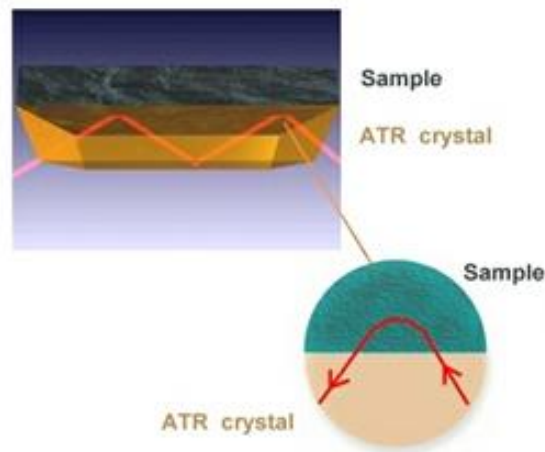


Figura 13. Muestra colocada sobre la placa de reflexión. (Fuente: Bruker).

En cuanto a los espectros, las absorbancias son independientes del espesor de la muestra ya que el haz solo penetra unos pocos micrómetros en la muestra. Una de las mayores ventajas que presenta este método es que la muestra no requiere ninguna preparación y se pueden obtener los espectros de absorción de una gran variedad de tipos de muestras.

### 3.3 Comparación FT-NIR y FT-MIR.

Los componentes con los que funcionan los equipos de FT-NIR y FT-MIR son esencialmente iguales (Sun, D-W. *et al.*, 2009). Donde se presentan las grandes diferencias son en los números de onda en los que trabajan y la radiación electromagnética empleada, haciendo que las moléculas respondan de forma distinta en uno u otro caso.

Los espectros de infrarrojo medio consisten en una señal clara y fuerte en la mayor parte de los casos. Sin embargo, los espectros de infrarrojo cercano son más complejos, poseen una señal más débil y con un mayor número de solapamientos que comprenden armónicos y combinaciones de absorciones. No obstante, estos espectros tienen una baja absorción debido al agua que hace posible el análisis de alimentos con un alto contenido en humedad. Además, el infrarrojo cercano está menos influenciado por la presencia de dióxido de carbono atmosférico, haciendo posible trabajar con los instrumentos NIR sin tener que crear un ambiente libre de humedad y de dióxido de carbono.

Por otro lado, las bandas del infrarrojo medio son entre 10 y 100 veces más intensas que sus correspondientes bandas en el infrarrojo cercano, permitiendo así el análisis directo de muestras con alta absorción y fuerte dispersión del haz, sin necesidad de diluir o realizar un complejo tratamiento previo de las muestras.

También Wu, D. *et al.* (2008) recogen en su investigación que las bandas en el infrarrojo cercano se corresponden principalmente a las vibraciones de los enlaces C-H, O-H y N-H, que son el origen de las bandas fundamentales que aparecen en el infrarrojo medio. Esto hace que sea posible la aplicación del infrarrojo medio para la detección de diferencias en la composición entre muestras tomando como base la vibración de los grupos químicos a un determinado número de onda. Además, las frecuencias e intensidades de las bandas de absorción pueden aportar información de los grupos funcionales más relevantes.

Por otro lado, la absorción en el infrarrojo cercano es baja, haciendo que sea una técnica menos sensible. Sin embargo, las bandas en el infrarrojo medio son fundamentales, por lo que el espectro es más sensible y su reproducibilidad, incluyendo la relación señal/ruido, es peor comparado con el NIR. (Lozano, M., 2013).

#### **4. Empleo de la espectroscopia FTIR-MIR en la evaluación de la calidad de los alimentos.**

La espectroscopia MIR es un método que permite determinar las estructuras moleculares (Sun, D-W., 2009). Los avances en la instrumentación junto con el desarrollo del análisis de datos multivariante hacen que este método se emplee para el análisis de grandes volúmenes de muestras. Esta operación comienza con un proceso de escaneo rápido que permite la detección de componentes que constituyen los alimentos hasta en pequeñas concentraciones, llegando a niveles de partes por billón (ppb). Por eso, la espectroscopia MIR tiene diversas aplicaciones en el análisis de alimentos pese a que su uso es relativamente reciente y no tan usual como el del infrarrojo cercano (NIR). En las últimas dos décadas se han realizado numerosas investigaciones de las posibles aplicaciones que ésta puede tener.

A continuación se presentan los estudios realizados en los diferentes campos de investigación. Este mismo estudio lo realizó María Lozano en su trabajo de fin de carrera en 2013, por lo que se va a emplear como base, realizando una revisión bibliográfica.

##### **4.1 Determinación de la composición química de los alimentos.**

En los últimos años, se ha estudiado la posibilidad de aplicar esta técnica para obtener de forma rápida y sencilla la composición química de los alimentos, especialmente, de aquellos parámetros que nos indiquen la calidad de los mismos. Así, ya en 2001, Ripoche, A. y Guillard, A. S. (2001) utilizaron la técnica para conocer el contenido en ácidos grasos de unas muestras de tejido graso, así como para intentar identificar cada uno de los ácidos grasos presentes. En este trabajo, los autores obtienen unas rectas de

regresión para la estimación del contenido en los distintos ácidos grasos con un coeficiente de regresión cuadrático de 0,96 para los ácidos grasos saturados y de 0,98 tanto para los monoinsaturados como para los polinsaturados. Este mismo estudio lo realizaron A. Flatten *et al.* en 2005. En 2004, Etzion, Y. *et al.* (2004) la usaron para conocer el contenido en proteína de unas muestras de leche, parámetro que sirve para conocer la calidad nutritiva de la misma. La estimación del contenido en proteína estaba influenciada por la presencia de otros componentes de la leche como el agua, la grasa o la lactosa y por lo tanto, era necesario conocer el contenido en estos elementos para poder obtener una estimación más precisa.

A partir de 2008, el número de estudios realizados en este ámbito ha aumentado considerablemente. Ruiz, D. *et al.* (2008) intentaron utilizar la técnica para poder establecer una relación entre el color de la piel de unas muestras de albaricoque con su contenido en carotenoides, obteniendo así un método rápido de análisis de este elemento. Sin embargo, los resultados obtenidos por estos autores no fueron satisfactorios, ya que aunque los coeficientes de regresión cuadráticos eran elevados en la calibración del método (entre 0,68 y 0,95), estos alcanzaban valores bajos (entre 0,10 y 0,44) durante la validación del mismo, por lo que el error cometido era alto. Y Wu, D. *et al.* (2008) utilizaron la técnica para conocer el contenido en grasa y proteína de unas muestras de leche deshidratada, siendo 0,956 en ambos casos el coeficiente de regresión cuadrático de las rectas entre los valores reales y estimados.

En 2009, este mismo autor (Wu, D. *et al.*, 2009) intenta determinar la composición en elementos minerales de unas muestras de leche deshidratada. Su principal objetivo era conocer el contenido en hierro y zinc, ya que estos minerales son de especial importancia en la nutrición humana. Sin embargo, estos autores no fueron capaces de señalar a qué número de onda aparece el pico producido por cada uno de estos elementos. Aun así, tras el tratamiento estadístico de los espectros, estos autores consiguen obtener unos coeficientes de regresión altos, cercanos a 0,9, siendo los resultados mejores que los obtenidos con el análisis mediante espectroscopia en el infrarrojo cercano (NIR). En este mismo año, también Shiroma y Rodríguez-Saona (2009) utilizaron esta técnica para conocer la humedad y el contenido en grasa que poseían unas muestras de patatas fritas y así conocer su calidad. Además, mediante esta técnica consiguieron determinar de forma rápida el grado de oxidación debido al uso de aceites de fritura parcialmente hidrogenados por la vibración del enlace C-H.

Por último, los estudios más recientes son del año 2014. Lopez-Villalobos, N. *et al.* (2014) consiguieron medir mediante esta técnica el contenido en ácidos grasos en leche para determinar si esos ácidos grasos son heredables. Para comprobar que la estimación de ácidos grasos mediante la espectroscopia MIR era fiable, se compararon

con los valores que obtuvieron mediante CG. Mediante esta comparación se obtuvieron unos coeficientes de determinación entre 0,63 y 0,94, lo que muestra que hay ecuaciones de regresión que permiten una estimación de ácidos grasos bastante precisos. Una investigación similar realizaron M. De Marchi *et al.* en 2011.

#### **4.2 Detección la presencia de bacterias en alimentos.**

En 1984, Naumann, D. (1984) demostró que la espectroscopia MIR era capaz de detectar, identificar y caracterizar bacterias ya que éstas presentan un espectro muy característico pudiendo llegar a ser único para cada tipo de cepa. Esto ocurre ya que el complejo espectro que se produce refleja toda la composición bioquímica de los microorganismos, con bandas asociadas a sus principales constituyentes entre los que se encuentran los lípidos, las proteínas, los ácidos nucleicos y los polisacáridos. Mariey, L. *et al.* (2001) y, más recientemente, Burgula, Y. *et al.* (2007) han recopilado las aplicaciones de la espectroscopia FT-MIR para la detección de bacterias.

Sin embargo, para la detección de alteraciones de la carne por parte de microorganismos su aplicación es aún bastante reducida. En 2001, Ellis, D.I. y Goodacre, R. (2001) recogen en su trabajo su posible aplicación ya que esta técnica sería más rápida y menos costosa que las actuales técnicas, entre las que destacan los análisis microscópicos basados en tinciones, la bioluminiscencia relacionada con las reacciones de ATP producidas por parte de las bacterias, la medida de fenómenos eléctricos producidos durante el crecimiento de las mismas, las detecciones basadas en los procesos inmunológicos o procedimientos relacionados con el análisis de ácidos nucleicos.

Este mismo autor en 2002 (Ellis, D. I. *et al.*, 2002), aplicó esta técnica para la medida de los cambios bioquímicos producidos en carne de pollo para intentar mejorar tanto la precisión como la rapidez de detección de la posible alteración por parte de los microorganismos. El estudio lo llevaron a cabo con pechuga de pollo, que dejaron a temperatura ambiente para su alteración durante 24 horas, realizando medidas cada hora directamente sobre la superficie de la carne. De forma paralela, para autenticar los resultados, llevaron a cabo análisis clásicos mediante siembras. De esta forma, determinaron que los picos observados entre 1500  $\text{cm}^{-1}$  y 700  $\text{cm}^{-1}$  estaban relacionados con la alteración, aunque no pudieron asociar un único punto a dicho proceso. Además, fijaron el umbral para separar entre carne fresca y alterada en 107 bacterias/g. Concluyendo finalmente, que el método FT-MIR podía ser de ayuda en el proceso de determinación de puntos críticos de control en las industrias. Dos años más tarde (Ellis, D. I. *et al.*, 2004), estos mismos autores estudiaron el potencial de esta técnica para el análisis de alteración de carne de vacuno. Sin embargo, los resultados obtenidos no

fueron tan buenos, lo que asociaron con el menor nivel de alteración alcanzado en la carne de vacuno en comparación con la de pollo.

Por último, Ammor, M. S. *et al.* (2009) monitorizaron la alteración de carne de vacuno envasada de forma convencional y mediante envases activos a cuatro diferentes temperaturas. Estos autores aseguran que consiguieron clasificar de forma correcta el 100 % de las muestras, además de poder diferenciar el tipo de envases en los que las muestras habían sido conservadas.

#### **4.3 Determinación de la autenticidad de los alimentos.**

La determinación del origen geográfico de los alimentos puede llevarse a cabo mediante diferentes técnicas entre las que se pueden encontrar la espectroscopia de masas, las técnicas de separación (cromatografía y electroforesis), las técnicas espectroscópicas (espectroscopia de resonancia magnética nuclear, espectroscopia de fluorescencia, espectroscopia atómica o espectroscopia de infrarrojo) y otras técnicas de tipo sensorial. (Luykx, D.M.A.M y van Ruth, S.M., 2008).

Diversos estudios han utilizado la espectroscopia MIR para diferenciar según el origen geográfico muestras de vino (Picque, D. *et al.*, 2005), queso (Karoui, R. *et al.*, 2005), aceite de oliva (Tapp, H.S. *et al.*, 2003) o miel (Ruoff, K. *et al.*, 2006).

En el caso del aceite de oliva, se ha conseguido diferenciar aceites procedentes de diferentes países europeos, siendo además, productos de diferentes variedades, lo que probablemente, haya ayudado a dicho logro. Además, se han conseguido obtener espectros prácticamente idénticos cuando se analizaban réplicas de una misma muestra, aunque los análisis se realizasen con unos días de diferencia, lo que aseguraría la reproducibilidad del método (Tapp, H. S. *et al.*, 2003).

Por otro lado, tal como explican Ruoff, K. *et al.* (2006) en su trabajo, también es posible el uso de la espectroscopia MIR para identificar el origen geográfico de distintas muestras de miel. Sin embargo, como concluyen estos autores, las diferencias geográficas encontradas con este método se pueden atribuir principalmente a las variaciones en el origen botánico de las flores.

#### **4.4 Determinación del sistema de producción de los alimentos.**

Aunque en este aspecto la espectroscopia MIR no está muy evolucionada, existen dos ejemplos de su posible aplicación. El primero de ellos fue estudiado por Cozzolino, D. *et al.* (2009), en el que pretendía el uso de este método para intentar diferenciar muestras de vino según su producción hubiese sido de tipo ecológica o industrial. En este estudio, consiguen mediante un análisis estadístico de componentes principales

diferenciar la mayor parte de las muestras, lo que concluyen que se debe no solo a un componente del vino sino a la compleja mezcla de todos ellos.

En el otro ejemplo, Arce, L. *et al.* (2009) consiguen diferenciar muestras de grasas subcutáneas procedentes de cerdos que habían sido alimentados de forma diferente. Por un lado, unos cerdos se habían producido de forma extensiva alimentándose únicamente de alimentos naturales, lo que es conocido como sistema de montanera. El resto de cerdos habían recibido una alimentación a base de formulados comerciales, diferenciándose dos grupos: los que había recibido alimentación estándar y los que habían sido alimentados con formulaciones especiales ricas en ácido oleico. Ambos ejemplos, permitirían tener un sistema de análisis rápido y detectar de forma precisa el sistema de producción evitando así los fraudes.

#### **4.5 Aplicaciones de MIR en el análisis de muestras de carne.**

Como se puede observar en esta breve revisión bibliográfica de aplicaciones y perspectiva futuras de la técnica, su uso en el análisis de muestras de carne es aún muy reducido, quedando casi limitado a la determinación de alteraciones de origen microbiano. También se han llevado a cabo estudios para intentar detectar fraudes por la adulteración de carne con muestras de otras especies de menor calidad o precio (Al-Jowder, O. *et al.*, 1997, 1999 y 2002; Alamprese, C. *et al.*, 2013), con proteínas de origen vegetal (Meza-Márquez, O.G. *et al.*, 2010) o con grasas de otras especies (Rohman, A. *et al.*, 2011).

Por ejemplo, Al Jowder, O. *et al.* (1997) diferencian entre carne cruda picada de pollo, cerdo y pavo mediante el uso del análisis de componentes principales. Adicionalmente, en cada una de las especies, intentan diferenciar entre carne fresca y carne que ha sufrido un proceso de congelación y descongelación. También, Downey, G. *et al.* (2000) dijeron que habían sido capaces de discriminar entre carne picada de pollo, pavo, cerdo, ternera y cordero basándose en el uso de espectroscopia MIR junto al visible y al NIR. Más tarde, Al Jowder, O. *et al.* (1999, 2002) consiguieron diferenciar entre músculo y diferentes tejidos viscerales (riñón, hígado, etc.) y detectar la adulteración por parte de estos mismos tejidos tanto en carne cruda como cocinada de ternera. Y en 1999, McElhinney, J. *et al.* utilizaron la espectroscopia MIR y visible-NIR para determinar el porcentaje de cordero de unas mezclas de carne picada de cordero y ternera.

El gran desarrollo de estos estudios se ha debido principalmente a la mayor concienciación actual sobre la importancia de cumplir la normativa en cuanto a etiquetado y por las objeciones de origen religioso que existen al consumo de determinadas especies animales. Por otro lado, pocos han sido los estudios llevados a cabo mediante FT-MIR para determinar parámetros químicos de productos cárnicos.

Solo Qiao, Y. *et al.* (2004) estudiaron el potencial de este método en la determinación del contenido en aminoácido de las dietas de los animales. Por ello, el campo de estudio en el ámbito de la carne es aún muy amplio, siendo muy numerosos los estudios que se pueden llevar a cabo. (Lozano, M., 2013).

En la Tabla 4 se recopilan las aplicaciones de la espectroscopia MIR al análisis de productos cárnicos, y en la tabla 5 se muestran algunos de las aplicaciones para el análisis de ácidos grasos.

Tabla 4. Aplicación de espectroscopia MIR en productos cárnicos (ternera).

Parámetro	Tratamiento previo de la muestra	Forma de medida	Rango de números de onda (cm <sup>-1</sup> )	Referencia bibliográfica
Determinación del contenido de cordero en carne picada de ternera y cordero.	Picado de las muestras	Reflectancia	4000-640	McElhinney, J. <i>et al.</i> , 1999.
Diferencias entre carne picada cruda de cerdo, pollo, pavo, ternera y cordero.	Picado de las muestras	Reflectancia	4000-640	Downey, G. <i>et al.</i> , 2000.
Diferencias entre carne cruda de ternera y ternera con un contenido del 20 % de adulterantes (tejido visceral).	Ninguno	Reflectancia	4000-800	Al-Jowder, O. <i>et al.</i> , 2002.
Crecimiento Bacteriano en carne de ternera.	Ninguno	Reflectancia	4000-600	Ellis, D. <i>et al.</i> , 2004.
Determinación adulteración en carne picada de ternera con pavo.	Picado y homogeneización	Reflectancia	4000-700	Alamprese, C. <i>et al.</i> , 2013.
Ternera almacenada al aire, en atmosfera modificada y en envases activos.	Ninguno	Reflectancia	4000-400	Ammor, M.S. <i>et al.</i> , 2009.



Tabla 5. Aplicación de la espectroscopia MIR en ácidos grasos.

Parámetro	Tratamiento previo de la muestra	Forma de medida	Rango de números de onda (cm <sup>-1</sup> )	Referencia bibliográfica
Estimación de ácidos grasos en leche	Ninguno	Absorbancia	5012-926	Lopez-Villalobos, N. <i>et al.</i> , 2014.
Determinación de ácidos grasos en leche	Extracción de grasa	Reflectancia	4000-900	De Marchi, M. <i>et al.</i> , 2011.
Determinación de los ácidos grasos C22:5 y C22:6 en grasa de cerdo	Extracción de grasa	Transmitancia	4000-500	Flåtten, A., <i>et al.</i> , 2005.
Determinación de ácidos grasos en cerdo	Extracción de grasa	Reflectancia	6000-900	Ripoche, A. <i>et al.</i> , 2001.

## *CAPÍTULO III: OBJETIVOS*

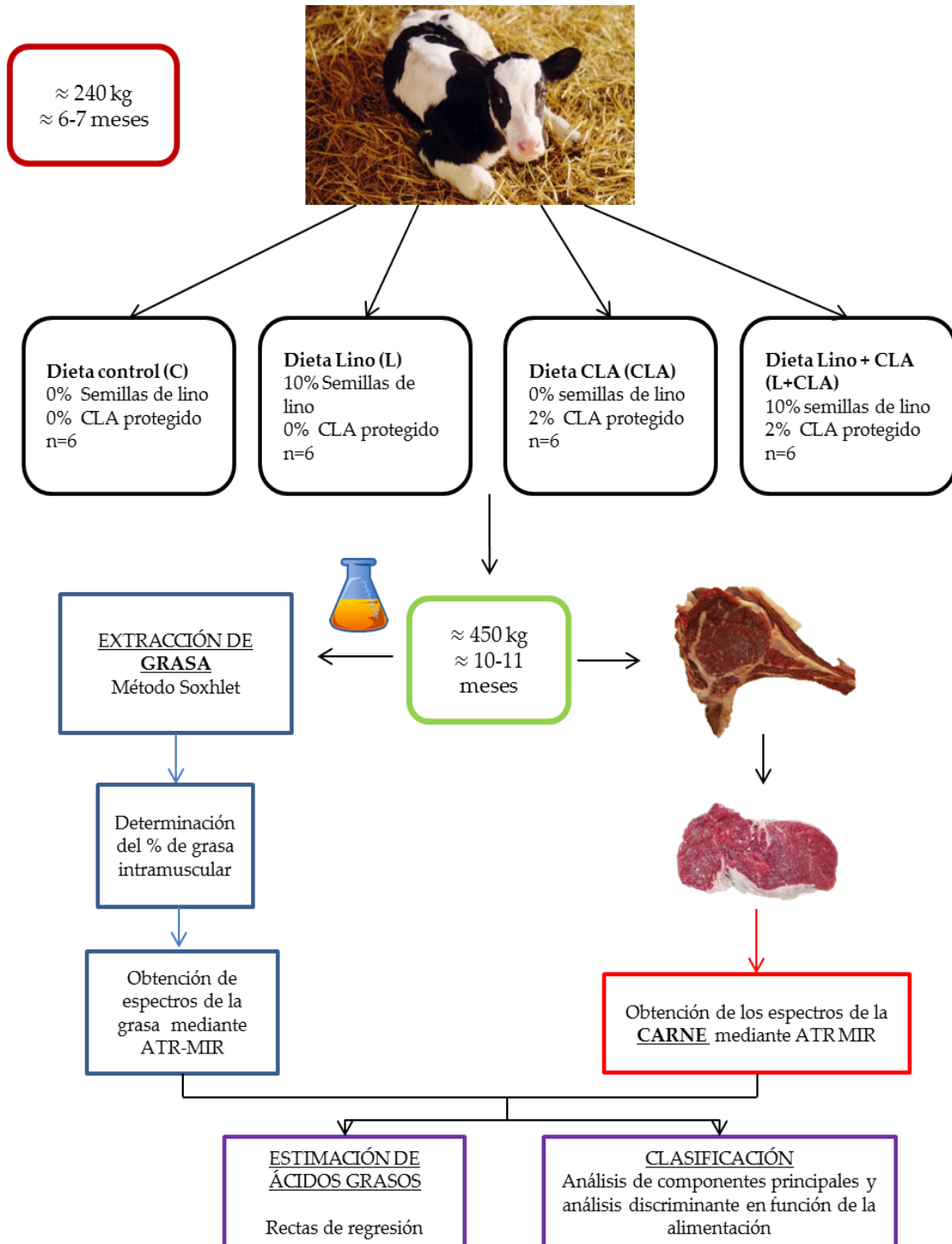
El objetivo del presente trabajo de fin de carrera es estudiar las medidas espectrales en el MIR obtenidas a partir de la carne y la grasa intramuscular de terneros frisonos alimentados con dietas enriquecidas con CLA y lino para estudiar en contenido en ácidos grasos de interés tecnológico y nutricional.

Además, a partir de las medidas espectrales se pretenden alcanzar los siguientes objetivos específicos:

1. Determinar si la alimentación enriquecida con CLA y lino influye sobre el contenido de grasa intramuscular de los terneros.
2. Deducir si la espectroscopia MIR es una técnica útil para diferenciar la carne de terneros alimentados con dietas enriquecidas en CLA y lino frente al sistema tradicional, en base a los espectros de la grasa intramuscular y de la carne.
3. Determinar la relación existente entre las técnicas de cromatografía gaseosa y la espectroscopia MIR.
4. Comprobar si el análisis de componentes principales y el análisis discriminante son métodos que permiten agrupar los espectros en base a la alimentación.

## *CAPÍTULO IV. MATERIAL Y MÉTODOS*

## 1. Diseño experimental.



## 2. Material animal y alimentación.

Para realizar este estudio se han empleado muestras de 24 terneros Holstein (sacrificados a  $458,6 \pm 9,79$  kg de peso corporal) de cuatro lotes que habían recibido cuatro tipos de dietas. Los animales fueron cebados durante un periodo de 123 días  $\pm$  11,2 días con una de las cuatro dietas isoenergética e isoproteicas: control (0% de lino, 0% de CLA), semillas de lino (10% de lino, 0% de CLA), CLA (0% de lino, 2% de CLA), y lino + CLA (10% de lino, 2% de CLA) [abreviadas C, L, CLA y L+CLA] (P. Alberti *et al.*, 2013). En la siguiente tabla (6) se muestran las diferentes alimentaciones y su composición:

Tabla 6. Ingredientes y composición de las dietas experimentales. (P. Alberti *et al.*, 2013).

	C	L	CLA	L+CLA
<b>Ingredientes en %</b>				
Harina de maíz	40,00	40,00	40,00	35,00
Harina de cebada	21,58	18,77	21,65	19,79
Harina de soja	15,09	13,21	15,07	13,10
Gluten	12,00	5,00	12,00	6,00
Pulpa de remolacha	4,00	9,69	4,00	12,00
Lino		10,00		10,00
CLA protegido del rumen			2,00	2,00
Aceite de palma	4,98	1,16	2,93	
Carbonato de calcio	1,23	1,05	1,23	0,99
Sal	0,20	0,20	0,20	0,20
Bicarbonato de sodio	0,50	0,50	0,50	0,50
Oxido de magnesio	0,20	0,20	0,20	0,20
Complejo de minerales y vitaminas <sup>a</sup>	0,20	0,20	0,20	0,20
Vitamina E <sup>b</sup>	0,02	0,02	0,02	0,02
<b>Análisis proximal</b>				
Proteína cruda (%)	15,00	15,30	15,00	15,37
Fibra de detergente neutro (%)	14,47	15,38	14,48	16,50
Fibra de detergente ácido (%)	5,57	6,91	5,57	7,44
Extracto de éter (%)	7,43	6,83	7,35	7,54
Ceniza (%)	4,85	4,96	4,85	5,08
Energía metabolizable (Mcal/kg)	2,94	2,95	2,94	2,97
<b>Perfil de ácidos grasos (% total de ácidos grasos)</b>				
AGS	42,5	21,7	42,0	29,3
AGM	28,1	20,9	26,4	18,3
AGP	29,1	57,2	28,4	49,1

C=control (concentrado); L=Con lino; CLA=con CLA; L+CLA=con lino + CLA

<sup>a</sup> Contenido por kg: Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 250 g, BHT 150 mg, MgO 50 g, Zn 20 g, Mn 15 g, Fe 2.5 g, Cu 1 g, Co 0.25 g, I 0.25 g, Se 0.1 g, vitamina E 5 mg, vitamina A 3,500,000 IU, vitamina D3 750,000 IU.

<sup>b</sup> Contiene 50%  $\alpha$ -tocoferol.

AGS: Ácidos Grasos Saturados; AGM: Ácidos Grasos Monoinsaturados; AGP: Ácidos Grasos Poliinsaturados.

El lino se añadió a la base del concentrado y el suplemento de CLA constaba de ésteres metílicos de CLA unidos a una matriz de sílice coloidal y recubierta con grasas vegetales hidrogenadas para proteger de la degradación ruminal.

A las 24 h después del sacrificio, la décima costilla del lado izquierdo de la canal fue retirada, se pesó, y se almacenó a 4 ° C para diseccionarla más tarde y determinar la cantidad de grasa intramuscular. La composición del tejido de la décima costilla se considera representativa de la composición de los tejidos de toda la canal (P. Alberti *et al.*, 2013).

En la siguiente tabla (7) se muestra el contenido en ácidos grasos del tejido intramuscular de los animales empleados en este proyecto.

Tabla 7. Efecto de la alimentación enriquecida con CLA y/o lino en los ácidos grasos (mg ácidos grasos/100g de carne) del tejido intramuscular en terneros Holstein (P. Alberti *et al.*, 2013).

	C	L	CLA	L+CLA	EEM	P-valor
<b>ΣAG</b>	1590,98	2146,66	1746,32	1911,97	202,047	0,260
<b>ΣAGS</b>	532,71	581,62	551,10	546,36	55,314	0,936
<b>ΣAGM</b>	873,13	1374,77	1008,04	1148,48	153,656	0,136
<b>ΣAGP</b>	185,14	190,28	187,18	217,13	13,068	0,284
<b>En6</b>	169,03	154,06	168,17	174,65	10,952	0,593
<b>En3</b>	11,83 <sup>b</sup>	29,81 <sup>a</sup>	12,51 <sup>b</sup>	33,59 <sup>a</sup>	1,837	0,000
<b>ΣCLA</b>	5,23 <sup>b</sup>	7,30 <sup>ab</sup>	7,43 <sup>ab</sup>	9,86 <sup>a</sup>	0,865	0,006
<b>C16:0</b>	285,88	300,34	287,63	271,46	30,094	0,926
<b>C18:0</b>	168,09	184,62	180,25	184,92	16,071	0,868
<b>C18:1t11 (VA)</b>	14,19 <sup>b</sup>	21,03 <sup>ab</sup>	14,97 <sup>b</sup>	26,31 <sup>a</sup>	2,724	0,009
<b>C18:1c9</b>	725,80	1203,22	856,82	984,51	143,514	0,127
<b>C18:2n6c9c12 (LA)</b>	106,71	95,07	106,36	111,46	7,116	0,422
<b>CLA9c11t (RA)</b>	2,29 <sup>b</sup>	3,90 <sup>b</sup>	3,83 <sup>b</sup>	5,93 <sup>a</sup>	0,513	0,000
<b>CLA10t12c</b>	0,95	0,90	0,93	0,97	0,108	0,970
<b>CLA9c10c</b>	1,07	0,76	1,32	0,75	0,219	0,210
<b>CLA9t11t</b>	0,93 <sup>c</sup>	1,75 <sup>ab</sup>	1,34 <sup>bc</sup>	2,21 <sup>a</sup>	0,191	0,000
<b>C18:3n3 (ALA)</b>	1,84 <sup>b</sup>	12,28 <sup>a</sup>	2,08 <sup>b</sup>	13,50 <sup>a</sup>	0,688	0,000
<b>C20:5n3 (EPA)</b>	2,39 <sup>b</sup>	4,91 <sup>a</sup>	2,54 <sup>b</sup>	5,91 <sup>a</sup>	0,456	0,000
<b>C22:5n3 (DPA)</b>	6,62 <sup>b</sup>	11,78 <sup>a</sup>	6,91 <sup>b</sup>	13,26 <sup>a</sup>	0,911	0,000
<b>C22:6n3 (DHA)</b>	0,97	0,84	0,98	0,92	0,121	0,834

<sup>a</sup> Baso en 12 animales/dieta. C = control; L = 10% lino; CLA = 2% CLA; L+CLA = 10% lino y 2% CLA. Diferentes letras en la misma fila indican que hay diferencias significativas ( $P < 0.05$ ). EEM: Error Estándar de la Media

AGS: Ácidos Grasos Saturados; AGM: Ácidos Grasos Monoinsaturados; AGP: Ácidos Grasos Poliinsaturados.

Σn-6: suma de C18:2n6t9t12, C18:2n6c9c12, CLA10t12c, C18:3n6, C20:3n6, C20:4n6 y C22:4n6

Σn-3: suma de C18:3n3, C20:5n3, C22:5n3 y C22:6n3

ΣCLA: suma de CLA9c11t, CLA10t12c, CLA9c11c y CLA9t11t

### **3. Análisis de las muestras.**

#### **3.1 Conservación y preparación de la muestra.**

Desde la fecha de sacrificio hasta el momento de su utilización las muestras fueron congeladas a -20°C.

Para realizar este proyecto cada muestra se separó en dos partes iguales, una para realizar la extracción de grasa y la otra para hacer las mediciones del músculo con el espectroscopio de infrarrojo medio.

Las muestras empleadas para la extracción de grasa fueron trituradas para facilitar el paso del disolvente y así mismo la extracción de la grasa intramuscular. Para esta prueba se realizaron dos repeticiones por animal y para cada extracción se emplearon 10 gr de carne triturada.

Para la prueba de la espectroscopia la muestra no recibió ningún tratamiento y se realizaron seis mediciones por animal. No fue necesario un peso exacto de muestra.

#### **3.2 Determinación del contenido en lípidos totales.**

El análisis del contenido en grasa de la muestra se realizó según la norma ISO-1443 y los Métodos de Análisis de Productos Cárnicos (BOE 20/01/82). Antes de iniciar el procedimiento, fue necesario secar los matraces durante unas horas en la estufa para eliminar completamente el agua que pudiese haber en el matraz y tras alcanzar la temperatura ambiente se pesó para así poder conocer su peso seco (P0). Una vez preparado todo el material, se realizó la extracción Soxhlet que consistió en introducir el papel de filtro con la muestra en un cartucho de extracción. Los primeros pasos a realizar para comenzar con esta operación fueron poner los baños de agua a calentar y abrir el agua de refrigeración, ya que el éter que se empleó como disolvente se evapora a una temperatura de 34,5°C, por lo que podía haber pérdidas. A continuación se introdujo el matraz de destilación en el baño de agua caliente (a 80°C aproximadamente) y se colocó este en el cuerpo del Soxhlet añadiendo éter hasta que sifonase. Una vez que el montaje estaba preparado se introdujo el cartucho en el cuerpo del Soxhlet.



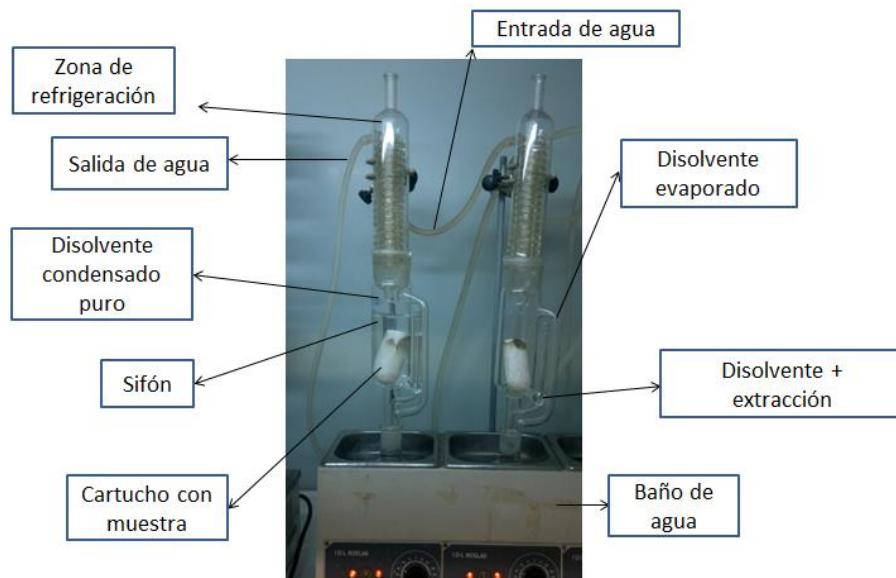


Figura 14.Extractor Soxhlet

Después de seis horas de extracción se eliminó el disolvente del matraz con el calor de los baños de agua, y para asegurarse que todo el disolvente fuera eliminado, se introdujo el matraz en una estufa, donde se mantuvo al menos durante hora y media a 75° C. Una vez enfriado el matraz en el desecador y alcanzado la temperatura ambiente, se pesó, repitiendo la pesada hasta que se hiciese constante (P1).

El proceso de extracción sigue el siguiente procedimiento. El éter es evaporado en el matraz debido al calor del baño de agua. Al evaporarse asciende hasta la zona de refrigeración donde se condensa y cae sobre la muestra que está en el interior del cartucho. Este proceso se repite hasta que en el sifón se alcanza la altura de éter necesaria para sifonar y el éter vuelve a caer en el matraz arrastrando la grasa disuelta de la muestra. Al caer el éter en el matraz se vuelve a evaporar dejando la grasa extraída en el fondo del matraz.

Al finalizar el proceso el éter que queda en el sifón es recogido para usarlo en siguientes extracciones, ya que al quedar la grasa en el fondo del matraz el éter en el sifón está limpio.

Una vez pesados los matraces y obtenido el peso en seco de la grasa, se añadió un poco de éter al matraz para disolver la grasa y se pasó a un recipiente más pequeño. Se evaporó el éter en los baños de agua y se introdujo el recipiente en una estufa a 70°C durante hora y media para acabar de disolver el éter. Una vez transcurrido ese tiempo las muestras de grasa se congelaron a -80°C para conservarlas hasta realizar las medidas en el espectroscopio de infrarrojo medio.

El porcentaje de grasa se calcula con la siguiente formula:

$$\% \text{ grasa} = \frac{P1-P0}{P2} \times 100$$

Siendo:

- P0= peso, en gramos, del matraz.
- P1= peso, en gramos, del matraz con la grasa.
- P2= peso, en gramos, de la muestra.

Para cada una de las muestras, el proceso se realizó por duplicado.

### 3.3 Tratamiento y preparación de las muestras para el análisis por FTIR.

Las muestras de grasa se sacaron el mismo día de la medición del congelador ya que eran cantidades pequeñas y se descongelaban muy rápido.

Las muestras de carne se sacaron a la nevera a 4°C el día anterior para que se descongelaran. Estas muestras no requirieron ningún tratamiento más ya que las mediciones en el espectrómetro se hacían directamente colocando una muestra de musculo sobre el ATR.

### 3.4 Análisis mediante espectroscopia MIR.

En este trabajo se ha utilizado como instrumento de medida un espectrómetro FT-IR (*Fourier Transform – Infrared* modelo Vertex 80v de la casa comercial Bruker (Figura 15). Este equipo permite trabajar a vacío para eliminar cualquier interferencia que el vapor de agua o el dióxido de carbono pudiera producir en la medida.

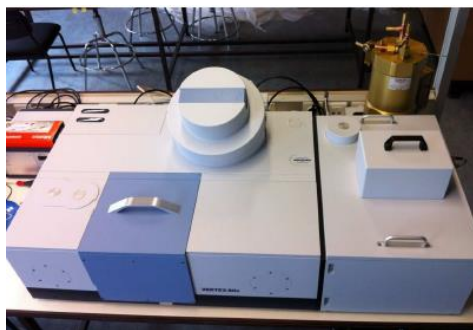


Figura 15. Equipo Bruker Vertex 80v.

Debido a que en este trabajo final de carrera se ha trabajado en la región del infrarrojo medio (MIR), el rango de medida se definió entre las longitudes de onda de 4000  $\text{cm}^{-1}$  a 400  $\text{cm}^{-1}$ .

Tanto para la medida de la grasa como la del músculo se ha utilizado el accesorio ATR. Este accesorio, tal y como se comenta en el apartado de antecedentes, permite hacer mediciones en MIR tanto el líquidos como en sólidos y obtener los espectros.

Las muestras de grasa se extraían con una paleta en pequeñas cantidades y se colocaban sobre la base del ATR. En la medición se realizaron 32 escaneos y se hicieron dos medidas por muestra extraída, es decir, 4 medidas por animal, dos por repetición. En el caso de la carne, al igual que en la grasa, se realizaron 32 escaneos y tal y como se ha comentado anteriormente, se hicieron 6 medidas por animal, es decir, 6 repeticiones.

#### **4. Tratamiento estadístico de los datos.**

El espectrofotómetro proporciono los espectros de absorción en las bandas del infrarrojo medio, en el intervalo 4000-400  $\text{cm}^{-1}$ .

Para realizar el tratamiento estadístico de los datos se emplearon dos programas. Por un lado se empleó Opus Quant 2 (Bruker, Ettlingen, Alemania) programa incluido en el equipo de espectroscopia, para obtener las rectas de regresión que permitía cuantificar la cantidad de ácidos grasos que hay en una muestra a partir de los espectros de la grasa obtenida de la extracción y de los espectros del músculo. Para ello se tomaron como valores de referencia la cantidad de ácidos grasos estimados en otro proyecto (Gómez, I., 2014) de las mismas muestras mediante la técnica de cromatografía gaseosa y mediante método PLS se obtuvieron los valores predichos. La relación de espectros y los valores de referencia es posible gracias al método anteriormente citado. Este método realiza un análisis de componentes principales con los espectros obteniendo componentes (factors) y loadings. Con estos elementos y mediante operaciones matriciales se calcula el valor predicho. Por lo tanto se obtuvieron tantas rectas de regresión como ácidos grasos seleccionados tanto para grasa como para músculo.

El otro programa empleado es el SPSS (v.20). Para ello, con el uso del programa informático Matlab R2012a, las muestras se redujeron a un conjunto menor de puntos de tal modo que todos los espectros presentasen las absorbancias para las mismas longitudes de onda. La reducción de los documentos se hizo para agilizar el funcionamiento de SPSS. Este programa se empleó para hacer un análisis de componentes principales y posteriormente un análisis discriminante para intentar agrupar las muestras y poder determinar si las agrupaciones eran correctas, con el objetivo de poder determinar un método que permita identificar a que grupo de alimentación pertenecen nuevas muestras.

## *CAPÍTULO V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN*

El apartado de resultado y discusión se ha dividido en 4 partes. En la primera de ellas, se muestran los resultados los lípidos intramusculares extraídos por medio de Soxhlet de la carne de los terneros de los cuatro lotes estudiados (C, CLA, L y L+CLA). En el segundo apartado se presentan los espectros FTIR-MIR obtenidos de la grasa y de la carne de las muestras. En la tercera parte se muestran los resultados del modelo de estimación obtenidos en los ácidos grasos de mayor interés tecnológico y nutricional. Y por último, se muestra los resultados obtenidos de la clasificación de las muestras mediante un Análisis de Componentes Principales (ACP) para estudiar el efecto de la alimentación en las medidas espectrales de las muestras estudiadas.

### **1. Cuantificación de la grasa intramuscular.**

En la siguiente tabla (8) se muestran los valores de los lípidos totales obtenidos por medio de Soxhlet para los diferentes animales.

Tabla 8: Contenido en grasa de las muestras obtenido en la extracción.

<b>Alimentación</b>	<b>Animal</b>	<b><math>\bar{x} \pm \sigma</math></b>	<b>CV</b>	<b><math>\bar{x}</math></b>	<b>Alimentación</b>	<b>CV Alimentación</b>
Control	125	2,21 ± 0,21	9,63	2,65	13.10	
	126	4,05 ± 0,74	18,31			
	136	1,70 ± 0,19	11,37			
CLA	130	2,98 ± 0,28	9,49	2,05	7.97	
	131	1,91 ± 0,05	2,38			
	132	1,29 ± 0,08	6,46			
	133	2,16 ± 0,33	15,29			
	134	1,43 ± 0,04	2,73			
	135	2,53 ± 0,29	11,48			
L	137	2,01 ± 1,16	57,49	2,08	15.03	
	138	3,19 ± 0,23	7,25			
	139	1,75 ± 0,11	6,29			
	140	0,74 ± 0,06	7,70			
	141	3,88 ± 0,27	6,93			
	142	0,94 ± 0,04	4,50			
L + CLA	143	0,66 ± 0,28	42,28	1,19	27.78	
	144	1,37 ± 0,52	37,62			
	145	1,45 ± 0,14	10,00			
	146	2,23 ± 0,19	8,70			
	147	0,64 ± 0,20	31,93			
	148	0,82 ± 0,30	36,13			
<b>Medias totales</b>		<b>1,9 ± 0,27</b>				

De cada animal se tomaron dos muestras de carne del musculo longissimus dorsi lumbar realizándose dos extracciones en Soxhlet, por lo tanto el porcentaje de grasa se

obtiene haciendo la media de los porcentajes obtenidos en cada repetición. Se observa que el contenido en grasa muestra una dispersión elevada para los animales que tuvieron la dieta enriquecida con L+CLA. En este lote la mayoría de los animales presentan dispersión. Además en el lote de animales con la dieta enriquecida en lino, la dispersión también es elevada, pero en este caso esa dispersión viene dada por un único animal, ya que el resto presentan coeficientes de variación más bajos. Los lotes control y CLA presentan una ligera dispersión. Los resultados del presente estudio corroboran los resultados de P.Albertí *et al.* (Albertí, P. *et al.* en 2013), que prueba que las dietas enriquecidas al 2% en CLA y 10% en lino no presentan diferencias significativas en el rendimiento de los animales, características de la canal, o en el desarrollo del tejido adiposo en novillos Holstein durante el engorde. El contenido lipídico de la muestra depende de la edad de sacrificio del animal, ya que cuanto mayor edad tiene el animal, presenta un mayor grado de engrosamiento de la canal y la carne (Asenjo, B. *et al.*, 2005; Daszkiewicz, T. *et al.*, 2004) y aumenta el contenido en tejido adiposo y el grosor del tejido subcutáneo (Hugo, A. y Root, E., 2007).

Otro factor que afecta al contenido lipídico de la carne es la alimentación y el sistema de explotación. La sobrealimentación incrementa el contenido de grasa intramuscular (Fernández, X. *et al.*, 1995) y si no consumen la alimentación necesaria puede producirse una reducción de la misma.

## **2. Características espectrales de las muestras.**

Como se ha señalado anteriormente en trabajo se emplean las medidas espectrales para desarrollar un método que sirva para poder analizar muestras de carne de forma rápida, sencilla y sin apenas alterar las muestras.

Este apartado se va a mostrar los espectros de carne y grasa obtenidos mediante espectroscopia FTIR-MIR, que corresponden a los apartados 2.2.1 y 2.2.2.

### **2.1 Asignación de las bandas espectrales representativas de los espectros FTIR de las grasas.**

En este apartado se van a relacionar los principales números de onda de la grasa con los grupos funcionales de interés.

En la figura 16 se representan los espectros FTIR-MIR de la grasa correspondientes a las diferentes dietas (control, CLA, lino y L+CLA) donde se diferencian dos zonas. La primera zona, entre  $3100\text{ cm}^{-1}$  y  $2750\text{ cm}^{-1}$ , corresponde a las vibraciones de enlaces que contiene hidrógeno como C-H. La segunda zona, desde aproximadamente  $1800\text{ cm}^{-1}$  hasta  $400\text{ cm}^{-1}$ , se atribuye a distintos modos de flexión y torsión de los enlaces. Esta

zona incluye la banda espectral denominada huella dactilar que abarca desde 1500  $\text{cm}^{-1}$  hasta 400  $\text{cm}^{-1}$  (Al-Jowder, O. et al., 1999; Karoui, R. *et al.*, 2010).

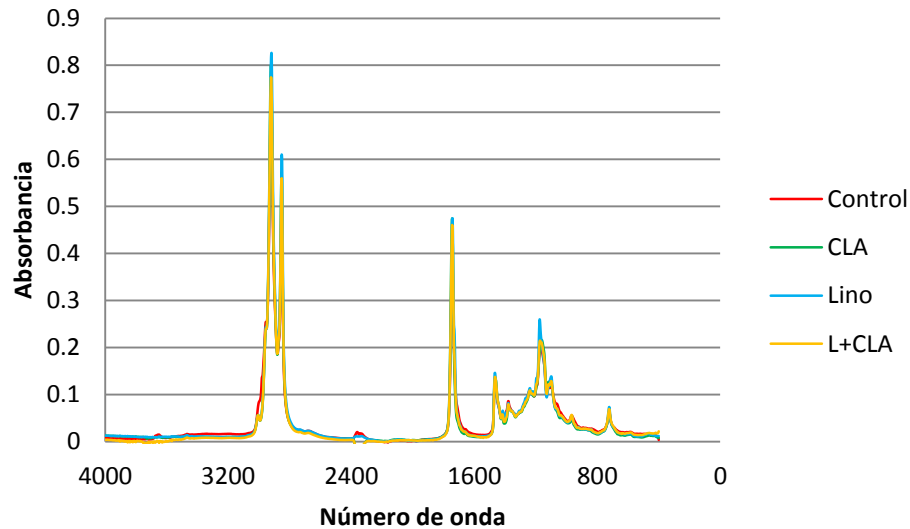


Figura 16. Espectros FTIR de 4 muestras de grasa: control, CLA, lino, L+CLA.

Como se puede observar en esta figura (16), las muestras de grasa procedentes de animales con diferentes alimentaciones presentan bandas de absorción que aparecen en números de onda similares pero con distintas intensidades de absorción. Por lo tanto, una conclusión es que las muestras contienen enlaces similares pero en diferente proporción. La tabla 9, resume la asignación de las bandas espectrales más relevantes.

Tabla 9: Asociación de los números de ondas con los grupos funcionales.

Números de onda (cm <sup>-1</sup> )	Grupo funcional	Referencia bibliográfica
3005	CH vibración de extensión del enlace <i>cis</i> =CH; ácidos grasos insaturados	(7; 45; 57;60)
2920	C-H vibración de extensión simétrica y asimétrica de CH <sub>2</sub> y CH <sub>3</sub> ; grupos alifáticos	(7; 29;45; 56; 57;60)
2854	C-H vibración de extensión simétrica y asimétrica de CH <sub>2</sub> y CH <sub>3</sub> ; grupos alifáticos	(7; 29;45; 56;57; 60)
1743	C=O vibración de extensión de los esteres; ácidos grasos libre	(7; 45; 53; 56; 57; 60)
1654	Vibración de extensión de los enlaces C=C <i>cis</i> .	(57; 60)
1465	Vibración de flexión de los grupos alifáticos CH <sub>2</sub> y CH <sub>3</sub> , (tijereteo)	(1; 7; 29; 45; 49; 53; 57)
1417	Vibración de balanceo de los enlaces <i>cis</i> CH en alquenos	(57)
1377	C-H vibración de flexión simétrica de los grupos alifáticos CH <sub>2</sub> y CH <sub>3</sub>	(7; 45; 57; 60)
1160	C-O vibración de extensión y C-H vibración de flexión	(7; 29; 45; 49)
1117	-CH vibración de flexión y -CH vibraciones de deformación de los ácidos grasos	(57)
721	C-H superposición de CH <sub>2</sub> vibrando en oscilación y las vibraciones fuera del plano; alquenos	(7; 45; 56; 57; 60)

Las diferentes bandas que se encuentran en torno a 3000 cm<sup>-1</sup> se asocian a distintos modos de vibración de los enlaces C-H presente en la grasa. Además la señal de baja intensidad que se observa alrededor de 3005 cm<sup>-1</sup> se atribuye a la vibración C-H del doble enlace C=CH en posición *cis* de los ácidos grasos insaturados. En cuanto a las señales que se encuentran en los números de onda 2920 cm<sup>-1</sup> y 2854 cm<sup>-1</sup>, se asocian a la vibración de extensión simétrica y asimétrica de los enlaces C-H de los grupos metileno (CH<sub>2</sub>) y metilo (CH<sub>3</sub>) de los ácidos grasos.

En la zona comprendida entre los números de onda 1800 cm<sup>-1</sup> y 400 cm<sup>-1</sup> destaca el pico situado en la longitud 1743 cm<sup>-1</sup> asociado con las vibraciones de extensión de los enlaces C=O de los ácidos grasos libres y la banda en torno a 1654 cm<sup>-1</sup> se asocia a los modos de vibración de extensión del enlace doble C=C de los alquenos.



Tras este pico el resto de bandas presentan una intensidad de absorción menor que las anteriormente nombradas. Sin embargo, no dejan de ser importantes. El pico que aparece en torno a  $1465\text{ cm}^{-1}$  se atribuye a la vibración de flexión de los enlaces C-H, denominada tijereteo.

Asimismo, la banda que aparece aproximadamente en  $1377\text{ cm}^{-1}$ , se asocia a las vibraciones de flexión simétrica de los enlaces C-H de los grupos metileno ( $\text{CH}_2$ ) y metilo ( $\text{CH}_3$ ) de los ácidos grasos. De la misma manera, el pico presente en torno a  $1160\text{ cm}^{-1}$  se asocia a la vibración de extensión del enlace C-O y a la vibración de flexión de los enlaces C-H y la banda presente alrededor de  $1117\text{ cm}^{-1}$  está relacionado con la vibración de flexión y deformación del grupo  $-\text{CH}$  de los ácidos grasos.

Entre los números de onda  $1000\text{ cm}^{-1}$  y  $400\text{ cm}^{-1}$  se encuentran un gran número de picos, de menor intensidad de absorción y más juntos entre sí, de los cuales destaca uno en la número de onda  $721\text{ cm}^{-1}$ , ya que presenta mayor intensidad de absorción que el resto. Este pico está asociado a la superposición del enlace C-H con el grupo metileno ( $\text{CH}_2$ ) vibrando en oscilación y fuera del plano. Estos enlaces se encuentran en los alquenos con una conformación *cis*.

En la figura 17, que se presenta a continuación, se puede observar el espectro FTIR-MIR de una muestra de grasa cualquiera, en concreto la 145, escogida entre todas las muestras, independientemente de la alimentación, ya que todas las muestras de grasa presentan los picos en los mismos números de onda. Tal y como se ha comentado anteriormente, la diferencia entre dietas es que la absorción para esos números de onda es diferente. En esta figura se señalan los números de onda más notables.

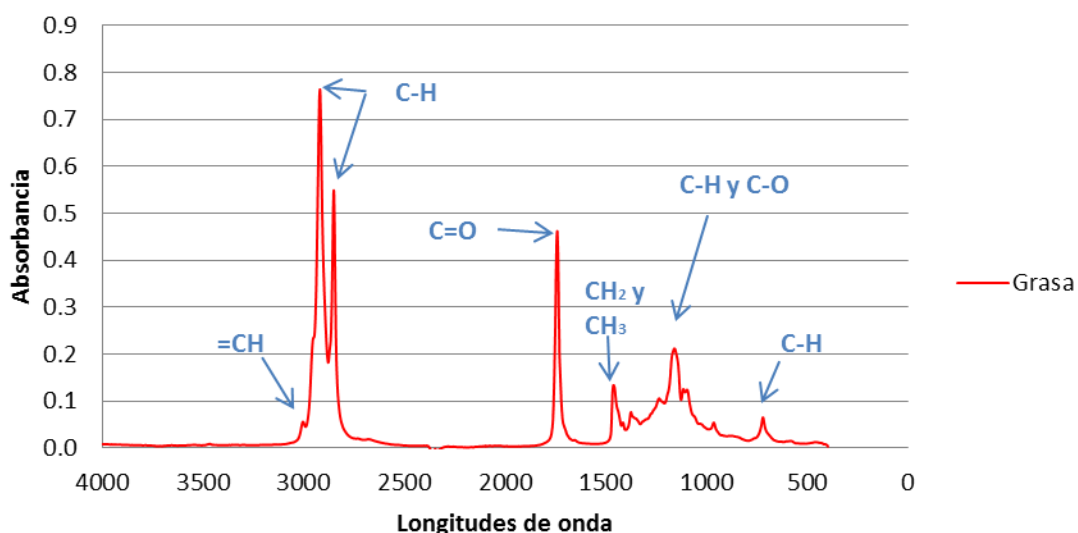


Figura 17. Espectro FTIR de grasa con los números de onda asociadas.

## **2.2 Presentación de las medidas espectrales de carne y grasa obtenidas a partir de los animales con espectroscopia FTIR-MIR.**

### 2.2.1 Espectros FTIR-MIR de las muestras de carne.

La figura 18 (A, B, C, D) que se representa a continuación muestra los espectros obtenidos del análisis de la carne de los animales agrupados en función de la alimentación recibida. Para cada animal se han realizado 6 repeticiones obteniendo un total de 144 espectros. Para este apartado se representa un espectro por animal obtenido mediante la media de los espectros de las 6 repeticiones. Tal y como se aprecia en las figuras, las cuatro gráficas son muy similares, la única diferencia aparente, es que los espectros, para el mismo número de onda, presentan diferentes absorbancias.

En la figura 18.A, se aprecian más diferencias entre animales debidas a las intensidades de absorbancias. Mediante la espectroscopia no solo se obtienen las vibraciones de los enlaces lipídicos ( $2920\text{ cm}^{-1}$ ,  $2854\text{ cm}^{-1}$  y  $1743\text{ cm}^{-1}$ ) también se obtienen las absorbancias debidas a las vibraciones de los enlaces de las proteínas, del agua ( $3900\text{ cm}^{-1}$ - $3200\text{ cm}^{-1}$ ), del dióxido de carbono ( $2500\text{ cm}^{-1}$ - $2300\text{ cm}^{-1}$ ) y más sustancias, es por eso que los picos característicos son similares en todos los animales y alimentaciones y puede que las diferencias de absorbancias sean debidas a este tipo de enlaces.

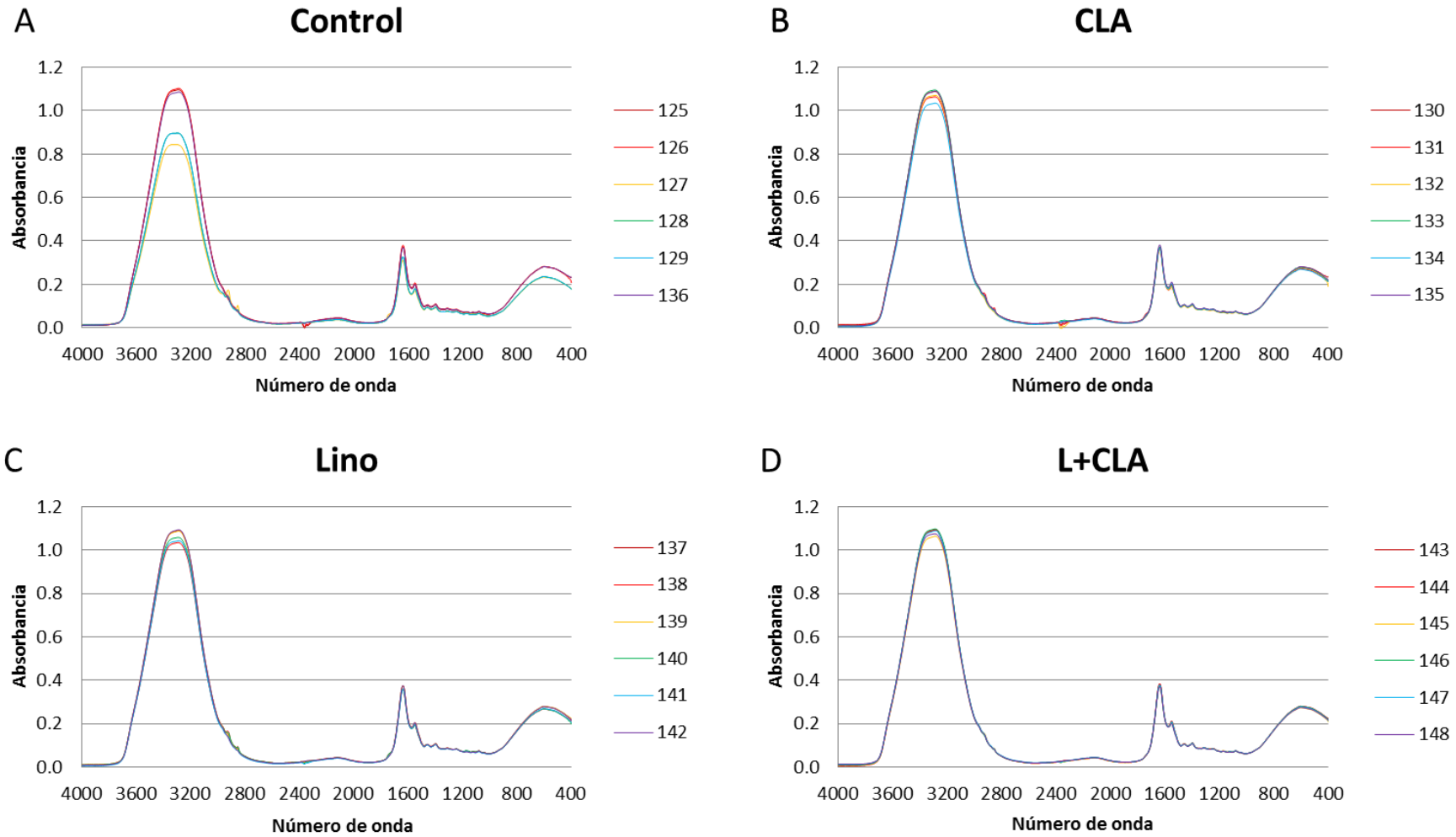


Figura 18. Representación de los espectros de carne obtenidos mediante espectroscopia FTIR-MIR.

### 2.2.2 Espectros FTIR-MIR de la grasa intramuscular extraída de las muestras.

En la figura 19 (A, B, C, D), se pueden observar los espectros obtenidos del análisis de la grasa extraída de las muestras. Se han realizado 4 repeticiones por animal obteniendo un total de 96 espectros. Con el fin de facilitar los análisis de datos, se ha procedido a realizar la media de los espectros de todas las repeticiones por animal, de tal manera que se representa 1 espectro por animal, 6 espectros por tipo de alimentación. En este caso las muestras apenas contienen agua, son mayoritariamente grasa. Como se puede observar (figura 19), los espectros son diferentes a los de carne.

En primer lugar, en la figura control (19.A), se observa que hay diferencias en torno al número de onda  $3005\text{ cm}^{-1}$ ,  $1170\text{ cm}^{-1}$  y en el pico descendente entre  $2920\text{ cm}^{-1}$  y  $2850\text{ cm}^{-1}$ . Las mayores diferencias que se pueden observar son diferencias de absorbancia que hacen que haya mayor variabilidad entre los espectros. En lo que respecta a los números de onda todos los animales y alimentaciones presentan los mismos picos en los mismos números de onda.

En segundo lugar se encuentra la gráfica (figura 19.B) correspondiente a la alimentación enriquecida con CLA. En este caso el pico que se encuentra en el número de onda  $3005\text{ cm}^{-1}$ , se ve más definido. Esto significa que todos los animales presentan una absorbancia más similar que en el caso de los animales con la dieta control. Además el pico en el número de onda  $1417\text{ cm}^{-1}$  es más pronunciado que en las demás alimentaciones.

En tercer lugar, en el gráfico que representa los espectros de los animales con una dieta enriquecida en lino (figura 19.C), aparentemente no se observan diferencias entre animales.

Y por último comentar que en el caso de la dieta L+CLA (figura 19.D), al igual que en el caso del lino, no se observan diferencias aparentes entre los animales.

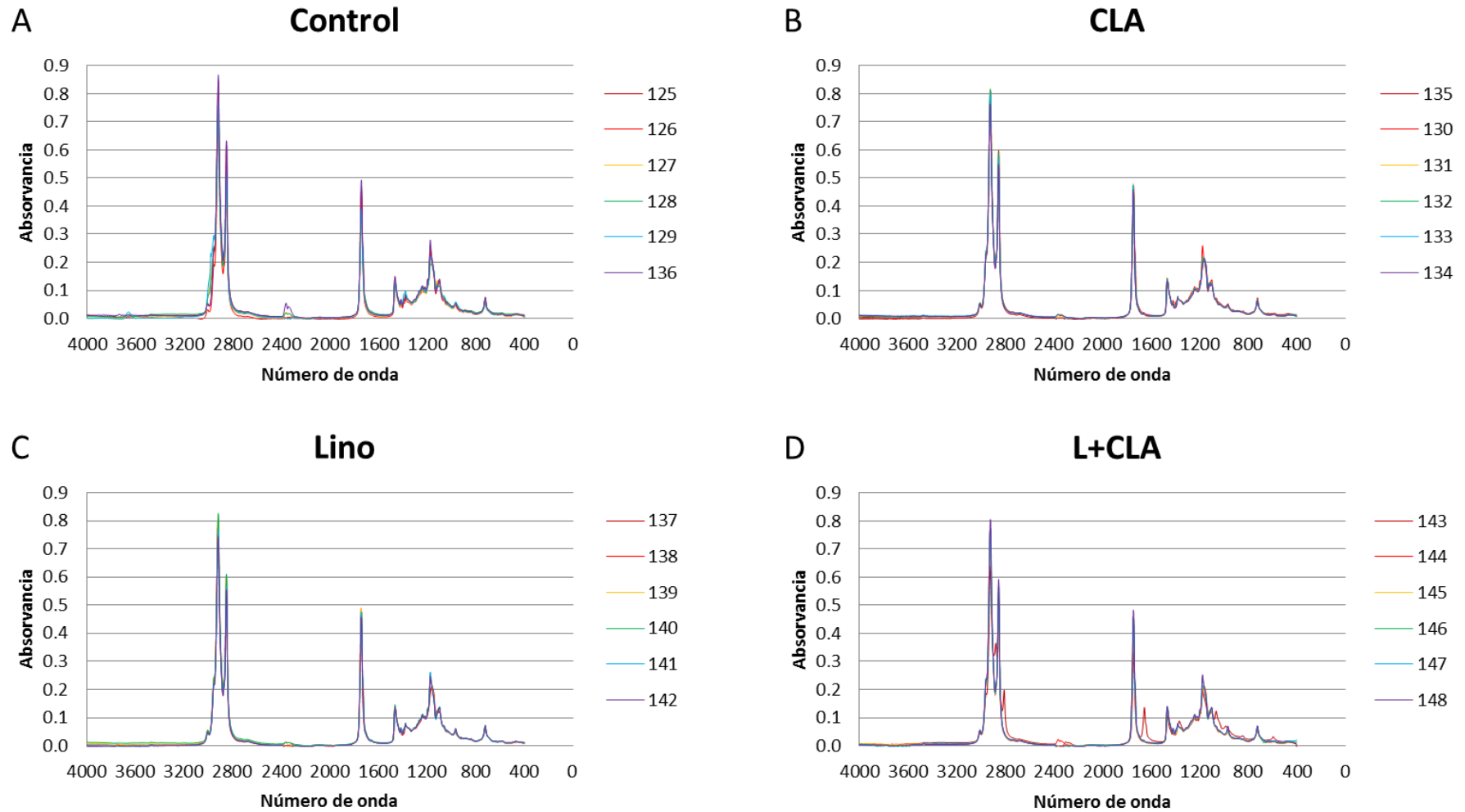


Figura 19. Representación de los espectros de grasa obtenidos mediante espectroscopia FTIR-MIR.

2.2.3 Comparación entre las medidas espectrales de la grasa intramuscular y de la carne de terneros.

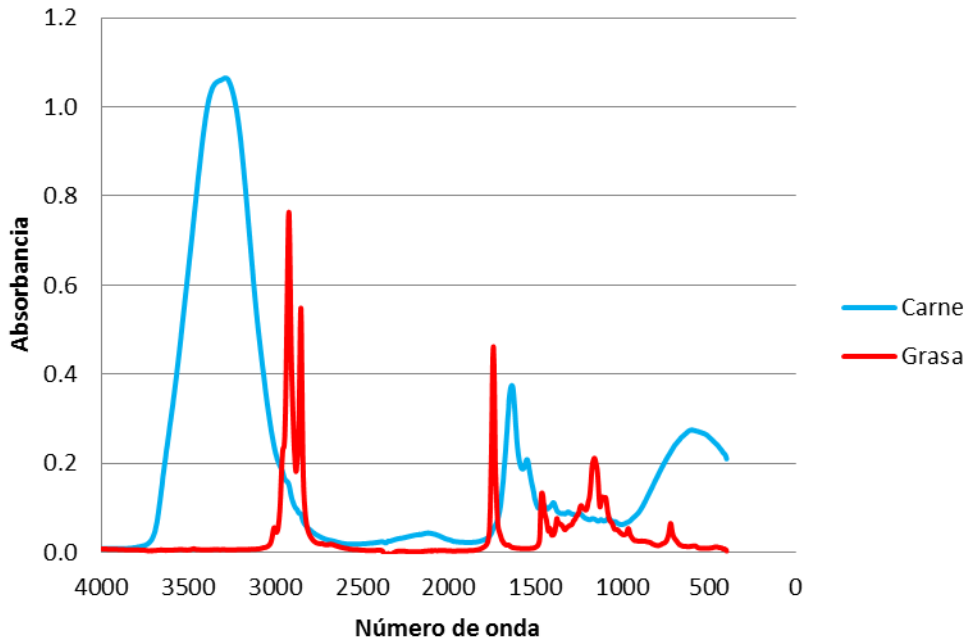


Figura 20. Representación de los espectros de carne y de grasa de un mismo animal.

En la figura 20 se puede observar un espectro de grasa y uno de carne, superpuestos de un mismo animal, de tal manera que se ven claramente las diferencias entre los dos espectros. En la muestra de carne se aprecian picos en los números de onda entre 3900  $\text{cm}^{-1}$  y 3200  $\text{cm}^{-1}$  y de 980  $\text{cm}^{-1}$  a 400  $\text{cm}^{-1}$  que en la grasa no se ven, esto es debido a que esos picos representan la vibración de los enlaces H-O presentes en el agua. La muestra de grasa que apenas contiene agua no presenta estos picos. Además al ser la absorbancia de estos picos tan elevada en la carne, enmascara los picos característicos de la grasa presentes en los mismos números de onda. En cuanto a las absorbancias presentes en los números de onda entre 2500  $\text{cm}^{-1}$  y 2300  $\text{cm}^{-1}$  son producidas por el  $\text{CO}_2$  presente en el ambiente. Al hacer el análisis estadístico de la carne no se tendrán en cuenta los números de onda asociadas al agua ni las asociadas al  $\text{CO}_2$  y en el caso de la grasa solamente se excluirán los números de onda asociadas al  $\text{CO}_2$ .

**3. Modelo de predicción del contenido de ácidos grasos de interés tecnológico y nutricional.**

En la tabla 10 se muestran los coeficientes de determinación ( $R^2$ ) de los modelos de predicción para cada ácido graso estudiado. Este coeficiente muestra el porcentaje de variación que explica el modelo. Además este valor fue obtenido mediante la representación de los valores verdaderos (los obtenidos mediante cromatografía

gaseosa en la tesis doctoral de Gómez, I., 2014) frente a los predichos con el propio método (PLS). Junto al coeficiente de determinación se muestran los errores cuadrados medios, tanto para la validación como para la calibración. El proceso de validación del modelo se ha realizado con el método de validación cruzada. Este método se basa en emplear todos los espectros para crear la función de calibración y posteriormente hace varias validaciones cogiendo dos muestras al azar hasta emplear todas las muestras para validar el método. Para que un modelo pueda ser adecuado para predecir nuevos valores debe estar validado, por lo que los coeficientes de determinación más importantes son los de la validación.

En la tabla 10 se presenta el modelo para la grasa y para la carne.

Tabla 10: Coeficientes de determinación ( $R^2$ ) y errores cuadráticos medios (RMSECV y RMSEE) para la calibración y validación del modelo de estimación del contenido en ácidos grasos.

Ácidos grasos	Grasa (g AG/ 100g grasa)				Carne (mg AG/ 100 g carne)			
	Validación		Calibración		Validación		Calibración	
	$R^2$	RMSECV	$R^2$	RMSEE	$R^2$	RMSECV	$R^2$	RMSEE
C18:2n6c9c12	59,63	1,80	82,58	1,23	34,45	15,60	46,73	14,60
C18:3n3	96,21	0,15	98,68	0,09	48,72	4,67	68,94	3,78
CLA9c11t	82,03	0,04	87,80	0,03	48,09	1,58	66,81	1,30
CLA10t12c	15,48	0,01	78,07	0,01	28,33	0,17	55,09	0,14
C20:4n6	57,49	0,64	77,04	0,49	25,36	8,08	51,90	6,72
C20:5n3	82,44	0,05	93,82	0,03	37,07	1,61	57,34	1,38
C22:5n3	86,61	0,06	95,34	0,04	35,41	3,41	52,82	3,04
C22:6n3	66,64	0,01	82,48	0,01	17,10	0,15	33,63	0,14
$\Sigma$ SFA	71,12	1,17	85,35	0,89	18,66	68,30	26,26	66,30
$\Sigma$ MUFA	76,85	1,83	93,63	1,03	32,42	292,00	53,64	252,00
$\Sigma$ PUFA	71,95	2,33	88,13	1,60	39,44	29,10	49,95	27,4
$\Sigma$ n6	57,72	2,53	82,98	1,70	29,02	23,80	47,98	21,00
$\Sigma$ n3	94,65	0,24	98,01	0,16	45,75	8,73	61,79	7,64
$\Sigma$ CLA	80,31	0,06	90,10	0,04	36,67	2,97	53,93	2,60
C18:0	62,47	0,89	83,26	0,63	33,38	23,60	41,27	22,70
C18:1c9	53,85	2,16	82,52	1,41	32,99	284,00	53,58	246,00
C18:1t11	81,17	0,35	91,29	0,25	28,35	8,12	47,60	7,13
C16:0	78,73	0,94	88,55	0,72	1,30	40,2	7,02	39,30

En el caso de las muestras de grasa, al contener pequeñas cantidades de agua los coeficientes de determinación son más elevados. Esto significa que en el modelo las diferencias entre el valor predicho y el valor verdadero son menores. Como se observa en los valores de  $R^2$ , algunos ácidos grasos presentan valores muy cercanos a 1, por lo que el modelo predice mejor los valores que se estiman, es decir, que se asemeja más al

valor real. En el caso de la grasa, el modelo para predecir el ácido graso C18:3n3 tiene un coeficiente de determinación de 96,21., siendo el modelo que más se aproxima al valor real. Mientras que el ácido graso CLA10t12c, presenta un coeficiente de determinación de 15,48, siendo el método que peor predice. Podría decirse que este método para predecir determinados ácidos grasos es aceptable cuando se emplean espectros de grasa. Además la espectroscopia FTIR-MIR permite agilizar la metodología de cuantificación de ácidos grasos si se compara con la cromatografía gaseosa, esta técnica es más rápida, requiere menos preparación de la muestra y es más barata que la cromatografía gaseosa (Ripoche, A. y Guillard, A.S., 2001; Hernández-Martínez, M. *et al.*, 2013).

Observando los resultados obtenidos a partir de las determinaciones sobre carne, se puede apreciar que los coeficientes de determinación son menores, esto se debe a que en estos espectros los picos de agua cubren parte de los picos representativos de la grasa, por lo que la predicción de los ácidos grasos es peor. Al igual que en la grasa, el ácido graso C18:3n3 presenta el mayor coeficiente de determinación con un valor de 48,72. Sin embargo, en este caso, el ácido graso C16:0 presenta el peor coeficiente de correlación, 1,298.

Un valor aceptable para la  $R^2$  sería a partir de 0.7 (Bruker, 2006), por lo tanto en los modelos creados a partir de los espectros de grasa 11/18 sería aceptables para estimar el contenido en ácidos grasos de nuevos espectros. Mientras que en los modelos obtenidos a partir de los espectros de la carne, ninguno de ellos supera ese valor, por lo que los espectros de la carne no aportan una predicción aceptable para los ácidos grasos seleccionados.

#### **4. Análisis de Componentes Principales (ACP) y análisis discriminante de la carne y grasa de terneros alimentados con dietas enriquecidas en CLA y lino.**

Como último objetivo del presente trabajo final de carrera, se han clasificar las muestras analizadas en función de la alimentación recibida a partir de las absorbancias a diferentes números de onda. Para realizar la clasificación se ha empleado el método de Análisis de Componente Principales (ACP). Los componentes principales son combinaciones lineales de las variables del sistema que permiten reducir el número de variables empleadas para el análisis.

Para realizar este análisis se han empleado todos los espectros FTIR-MIR, de tal manera que la clasificación en base a la alimentación se basa en las absorbancias obtenidas. A continuación se muestran los resultados de la carne y de la grasa, por separado y se especifica que números de onda se han tenido en cuenta para cada análisis, de tal manera que solo se emplean las regiones más características.



#### 4.1 Muestras carne.

Para este análisis se han excluido los números de onda que presentaban los enlaces de agua y de dióxido de carbono. Se han excluido las regiones las siguientes regiones espectrales:

- De 4000  $\text{cm}^{-1}$  a 3200  $\text{cm}^{-1}$ .
- De 2500  $\text{cm}^{-1}$  a 2300  $\text{cm}^{-1}$ .
- De 980  $\text{cm}^{-1}$  a 400  $\text{cm}^{-1}$

Tal y como se ha comentado anteriormente, el primer paso para clasificar las muestras es la realización del Análisis de componentes principales. Según los resultados obtenidos, son necesarios 10 factores para que se explique el 99,4% de la variación. Sin embargo solo los primeros 4 componentes explican el 96,49% de la variabilidad de las muestras, aunque los más importantes son los primero dos componentes, ya que explican un 69,45% y 13,33% de la variación respectivamente.

Tabla 11. Porcentaje de variabilidad explicado por los cuatro primeros componentes principales.

Número de componente	% de variabilidad
1	69,445
2	13,332
3	9,513
4	4,201
<b>Total</b>	<b>96,491</b>

Tras el análisis de componentes principales se realiza un análisis discriminante con todos los componentes principales. Este análisis intenta buscar las diferencias entre los animales, de tal manera que intenta agruparlos basándose en las semejanzas de las absorbancias de los espectros. A continuación se muestra la tabla (12) con los porcentajes de clasificación.

Tabla 12. Resultados de la clasificación de los espectros de carne.

		Grupo de pertenencia pronosticado				
		Alimentación	Control	CLA	Lino	L+CLA
Original	%	Control	<b>63,9</b>	19,4	2,8	13,9
		CLA	5,6	<b>44,4</b>	16,7	33,3
		Lino	5,6	22,2	<b>36,1</b>	36,1
		L+CLA	8,3	2,8	19,4	<b>69,4</b>
Validación cruzada	%	Control	<b>61,1</b>	22,2	2,8	13,9
		CLA	5,6	<b>33,3</b>	25,0	36,1
		Lino	5,6	22,2	<b>33,3</b>	38,9
		L+CLA	8,3	5,6	33,3	<b>52,8</b>

Como se observa en la tabla (12) los porcentajes de clasificación de los espectros de la carne se presentan en dos grupos. El "Original" representa los valores obtenidos al crear el método de calibración, y la validación cruzada muestra los resultados de la validación. Para poder sacar conclusiones se deberían mirar los resultados de la validación. Además los porcentajes de clasificación no son muy elevados, un valor aceptable estaría en torno al 70%, por lo que no se ve una diferenciación clara entre los diferentes grupos. En el caso del CLA y del lino, clasifica un mayor número de muestras en el grupo correspondiente a L + CLA. A continuación se muestra la representación gráfica de la clasificación para comprobar que no se aprecian bien los cuatro grupos.

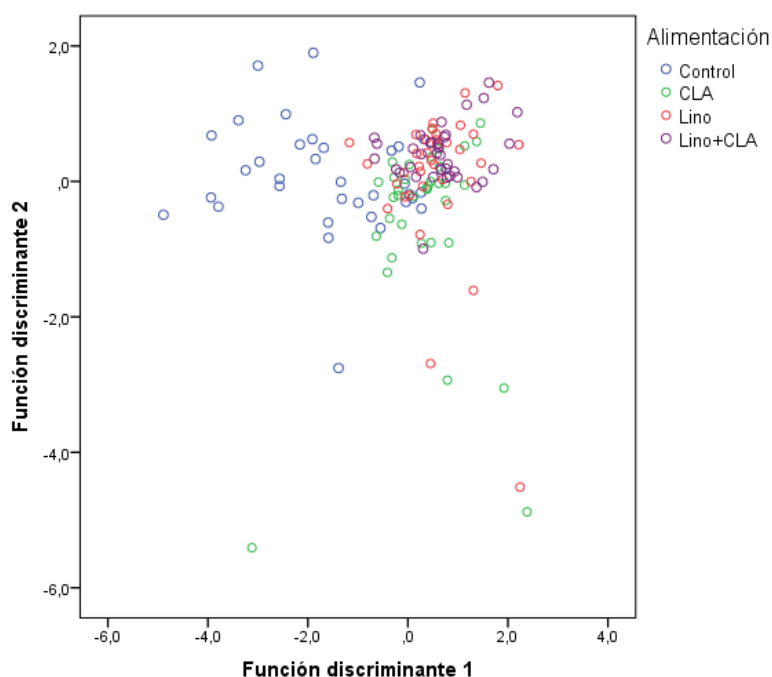


Figura 21. Representación de la función discriminante uno y dos.

## 4.2 Muestras grasa.

Para realizar este análisis se han excluido los números de onda de 2800 cm<sup>-1</sup> a 2300 cm<sup>-1</sup> ya que corresponden a los enlaces presentes en el dióxido de carbono. Al igual que se realiza en el análisis estadístico de la carne, se han empleado todos los espectros de la grasa para realizar el ACP. En este caso se han obtenido 15 componentes principales. En la siguiente tabla (13) se muestran los resultados de los seis primeros componentes principales, que explican el 94% de la variación.

Tabla 13. Porcentaje de variabilidad explicado por los seis primeros componentes principales.

Número de componente	% de variabilidad
1	56,82
2	17,39
3	6,54
4	5,42
5	4,32
6	3,74
<b>Total</b>	<b>94,23</b>

El siguiente paso es realizar el análisis discriminante empleando todos los componentes principales. Al igual que en el caso anterior, se pretenden encontrar diferencias entre los distintos grupos de alimentación. A continuación se muestra una tabla con los resultados de la clasificación.

Tabla 14. Resultados de la clasificación de los espectros de grasa.

	Alimentación	Grupo de pertenencia pronosticado			
		Control	CLA	Lino	L+CLA
Original	Control	<b>95,2</b>	0,0	4,8	0,0
	CLA	4,2	<b>95,8</b>	,0	,0
	Lino	0,0	12,5	<b>79,2</b>	8,3
	L+CLA	0,0	0,0	8,3	<b>91,7</b>
Validación cruzada	Control	<b>85,7</b>	4,8	9,5	0,0
	CLA	8,3	<b>91,7</b>	0,0	0,0
	Lino	0,0	12,5	<b>75,0</b>	12,5
	L+CLA	0,0	4,2	20,8	<b>75,0</b>

En este caso, tal y como se puede ver en la tabla (14), la clasificación de los espectros es mejor. Esto es debido a que las muestras de grasa no contienen agua que enmascaren los picos representativos y se ven mejor las diferencias. Para el grupo de animales

alimentados con una dieta enriquecida en lino y L+CLA el 75% de los espectros han sido bien clasificados. Para la dieta enriquecida con CLA el 91,7% y para la dieta control el 85,7%. Estos valores son aceptables, por lo que se espera que al representarlos gráficamente se diferencien los cuatro grupos. Pese a haber variabilidad en el método, y no poder predecir el valor de nuevas muestras al 100%, el error que se comete no es tan elevado y el método de obtención de los espectros es más rápido que los métodos convencionales.

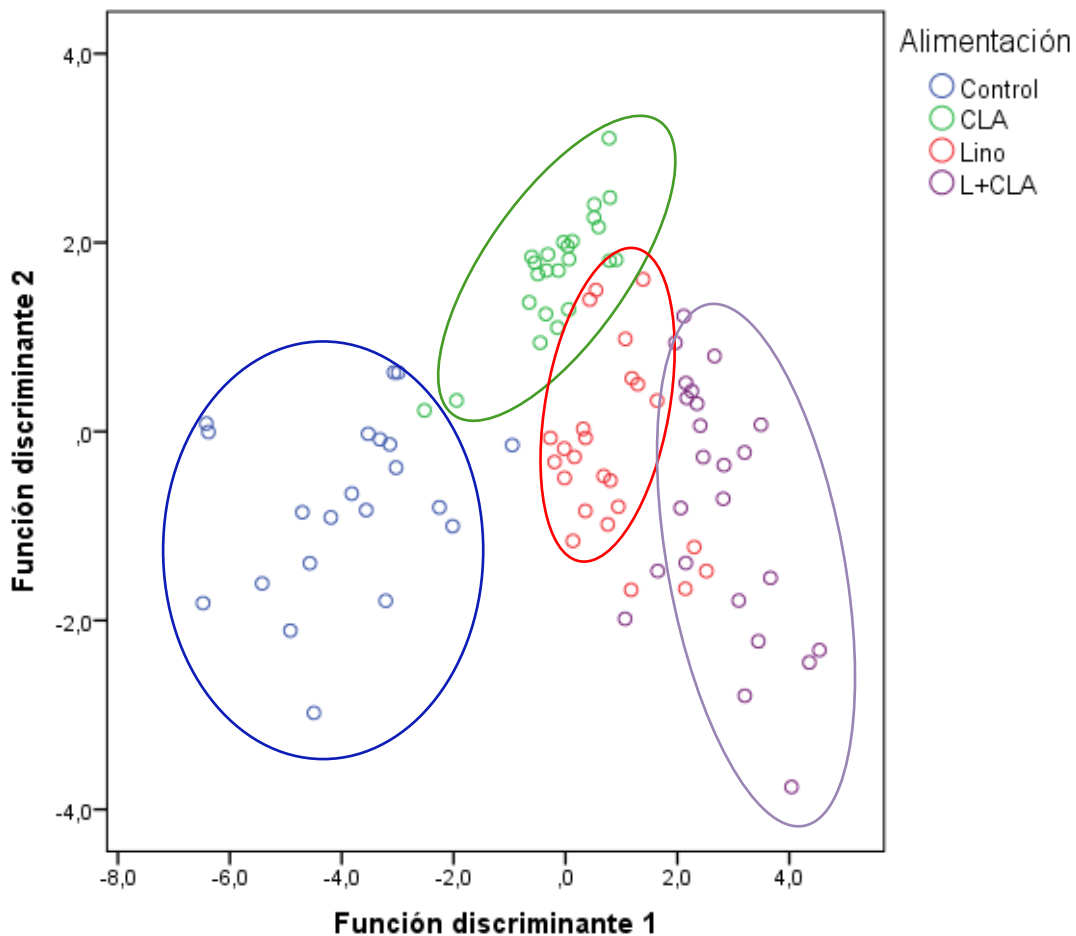


Figura 22. Representación de las funciones discriminantes uno y dos.

En esta figura (22) se aprecian claramente los cuatro grupos de animales. Esto significa que se podrían clasificar nuevos animales mediante espectroscopia FTIR-MIR. Por lo que el método de clasificación mediante los componentes principales y posterior análisis discriminante sería útil en el caso en el que se tuvieran espectros de grasa.

## *CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES*

Con el material y métodos empleados y a partir de los resultados obtenidos, en el presente trabajo se han alcanzado las siguientes conclusiones:

- 1) La espectroscopia FTIR-MIR permite estimar de forma rápida el contenido en ácidos grasos de las muestras de grasa. Las rectas de regresión obtenidas mediante la comparación de los valores predichos y los valores reales obtenidos con la cromatografía gaseosa, indican que la estimación es mejor cuando se trabaja con espectros de grasa que cuando se trabaja con espectros de carne.
- 2) Los ácidos grasos omega-3, importantes desde el punto de vista nutricional han resultado ser los mejor estimados en su contenido a partir de esta metodología basada en los espectros de la grasa intramuscular.
- 3) Los picos presentes en torno a  $2920\text{ cm}^{-1}$ ,  $2854\text{ cm}^{-1}$  y  $1743\text{ cm}^{-1}$  están asociados a la vibración de los enlaces característicos de los ácidos grasos. Por eso son los que mayor intensidad de absorción presentan en los espectros de grasa.
- 4) Dado que los espectros de la carne no son adecuados para identificar el contenido en grasa de los animales debido al contenido de agua presente en las muestras, es necesario llevar a cabo nuevas investigaciones para eliminar las interferencias de la misma, ya que enmascara parte de los picos representativos de la grasa.
- 5) En Análisis de Componentes Principales (ACP) permite la clasificación de las muestras de grasa en función de las absorbancias de los espectros, pero no permite la clasificación de las muestras de carne.
- 6) Sin embargo, las dietas enriquecidas con 2% CLA y/o 10% lino, no afectan al contenido lipídico intramuscular del animal.

## *CAPÍTULO VII. BIBLIOGRAFÍA*

1. Alamprese, C.; Casale, M.; Sinelli, N.; Lanteri, S.; Casiraghi, E. (2013). Detection of minced beef adulteration with turkey meat by UV-vis, NIR and MIR spectroscopy. *Food Science and Technology*, 53, 225-232.
2. Alberti, P.; Gómez, I.; Mendizabal, J.A.; Ripoll, G.; Barahona, M.; Sarriés, V.; Insausti, K.; Beriain, M.J.; Purroy, A.; Realini, C. (2013). Effect of whole linseed and rumen-protected conjugated linoleic acid enriched diets on feedlot performance, carcass characteristics, and adipose tissue development in young Holstein bulls. *Meat Science*, 94, 208-214.
3. Al-Jowder, O.; Defernez, M.; Kemsley, E. K.; Wilson, R. H. (1999). Mid- Infrared Spectroscopy and Chemometrics for the Authentication of Meat Products. *Food Chemistry*, 47, 3210-3218.
4. Al-Jowder, O.; Kemsley, E. K.; Wilson, R. H. (1997). Mid-Infrared Spectroscopy and authenticity problems in selected meats: A feasibility study. *Food Chemistry*, 59, 195-201.
5. Al-Jowder, O.; Kemsley, E.K.; Wilson, R.H. (2002). Detection of Adulteration in Cooked Meat Products by Mid-Infrared Spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 1325-1329.
6. Ammor, M. S.; Argyri, A.; Nychas, G. (2009). Rapid monitoring of the spoilage of minced beef stored under conventionally and active packaging conditions using Fourier transform infrared spectroscopy in tandem with chemometrics. *Meat Science*, 81, 507-514.
7. Arce, L.; Domínguez-Vidal, A.; Rodríguez-Estévez, V.; López-Vidal, S.; Aroya-Cañada, M.J.; Valcárcel, M. (2009). Feasibility study on the use of infrared spectroscopy for the direct authentication of Iberian pig fattening diet. *Analytica Chimica Acta*, 636, 183-189.
8. Asenjo, B.; Miguel, J.A.; Ciria, J.; Calvo, J.L. (2005). Factores que influyen en la calidad de la carne. (Incluido en: Cañeque, V.; Sañudo, C. Estandarización de las metodologías para evaluar la calidad del producto (animal vivo, canal, carne y grasa)). INIA, 291-299.
9. Babcock, S. M. (1890). A new method for the estimation of fat in milk especially adapted to creameries and cheese factories. University of Wisconsin, Agricultural Experiment Station, 24.
10. Bligh, E.G.; Dyer, W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal Biochemistry Physiology*, 37, 911-917.
11. BOE 20/1/1982. Orden de 1 de diciembre de 1981 por la que se establecen métodos oficiales de análisis de aguas, aceites y grasas, carne y productos



- cárnicos, fertilizantes, productos fitosanitarios, leche y productos lácteos, productos orgánicos, fertilizantes, suelos y productos derivados de la uva y similares.
12. Burgula, Y.; Khali, D.; Kim, S.; Krishnan, S.S.; Cousin, M.A.; Gore, J.P.; Reuhs, B.L.; Mauer, L.J. (2007). Review of mid-infrared Fourier transform infrared spectroscopy application for bacterial detection. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology*, 15, 146-175.
  13. Código Alimentario Español, 1967. (Decreto 2848/1967).
  14. Cozzolino, D.; Holdstock, M.; Damberg, R.G.; Cynkar, W.U.; Smith, P.A. (2009). Mid infrared spectroscopy and multivariate analysis: A tool to discriminate between organic and non-organic wines grown in Australia. *Food Chemistry*, 116, 761-765.
  15. Daszkiewicz, T.; Denaburski, J.; Sáiz, F. (2004). Efecto de la grasa intramuscular sobre la calidad sensorial de la carne. *Avances en Tecnología Porcina*, 1, 4-12.
  16. Downey, G.; McElhinney, J.; Fearn, T. (2000). Species identification in selected raw homogenized meats by reflectance spectroscopy in the midinfrared, near-infrared and visible ranges. *Applied Spectroscopy*, 54, 894-899.
  17. Ellis, D. I.; Broadhurst, D.; Goodacre, R. (2004). Rapid and quantitative detection of the microbial spoilage of beef by Fourier transform infrared spectroscopy and machine learning. *Analytica Chimica Acta*, 514, 193-201.
  18. Ellis, D. I.; Broadhurst, D.; Kell, D. B.; Rowland, J. J.; Goodacre, R. (2002). Rapid and quantitative detection of the microbial spoilage of meat by Fourier transform infrared spectroscopy and machine learning. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 2822-2828.
  19. Ellis, D.I. y Goodacre, R. (2001). Rapid and quantitative detection of the microbial spoilage of muscle foods: current status and future trends. *Trends in Food Science and Technology*, 12, 414-424.
  20. Etzion, Y.; Linker, R.; Cogan, U.; Shmulevich, I. (2004). Determination of Protein Concentration in Raw Milk by Mid-Infrared Fourier Transform Infrared/Attenuated Total Reflectance Spectroscopy. *Journal of Dairy Science*, 87, 2779-2788.
  21. FAO (2012). Grasa y ácidos grasos en nutrición humana.
  22. Fernández, X.; Mourot, J.; Mounier, A.; Ecolan, P. (1995). Effect of muscle type and food deprivation for 24 hours on the composition of the lipid fraction in muscles of large white pigs. *Meat Science*, 41, 335-343.

23. Flåtten, A.; Bryhni, E. A.; Kohler, A.; Egelanddal, B.; Isaksson, T. (2005). Determination of C22: 5 and C22: 6 marine fatty acids in pork fat with Fourier transform mid-infrared spectroscopy. *Meat science*, 69(3), 433-440.
24. Folch, J.; Lees, M.; Stantley, G.H.S. (1957). A simple method for the isolation and purification of lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226, 497-509.
25. Gerber, N. (1981). Neuer Butyrometer. Patent CH2621, (1891-01-31), Bern: Eidgenössisches Institut für Geistiges Eigentum.
26. Gomez, I. (2014). Beef enriched with n-3 and CLA and attitude of consumers towards functional foods. Technological aptitude for the production of new healthy products.
27. Guillén, M.D.; Cabo, N. (2000). Some of the most significant changes in the Fourier transform infrared spectra of edible oils under oxidative conditions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 2028-2036.
28. Hernández Gil, A. (2010). Tratado de nutrición. Composición y Calidad Nutritiva De Los Alimento. Volumen 2. Editorial *Panamericana*. Madrid, España.
29. Hernández-Martínez, M.; Gallardo-Velázquez, T.; Osorio-Revilla, G.; Almaraz-Abarca, N.; Ponce-Mendoza, A., Vásquez-Murrieta, M.S. (2013). Prediction of total fat, fatty acid composition and nutritional parameters in fish fillets using MID-FTIR spectroscopy and chemometrics. *Food Science and Technology*, 52, 12-20.
30. Higson, S.P.J. (2007). Química analítica. Editorial McGraw-Hill.
31. Hugo, A.; Roodt, E. (2007). Significance of porcine fat quality in meat technology: a review. *Food Reviews International*, 23, 175-198.
32. Introduction to FT-IR Spectroscopy. Bruker.
33. ISO 1443:1973, Meat and meat products. Determination of total fat content.
34. ISO 1444:1996. Meat and meat products. Determination of free fat content.
35. ISO 1735:2004. Cheese and processed cheese products. Determination of fat content. Gravimetric method (Reference method).
36. ISO 1737:2008. Evaporated milk and sweetened condensed milk. Determination of fat content. Gravimetric method (Reference method).
37. ISO 8262-3:2005. Milk products and milk-based foods. Determination of fat content by the Weibull-Berntrop gravimetric method (Reference method). Part 3: Special cases.

38. Karoui, R.; Bosset, J.O.; Mazerolles, G.; Kulmyrzaev, A.; Dufour, E. (2005). Monitoring the geographic origin of both experimental French Jura hard cheeses and Swiss Gruyère and L'Etivaz PDO cheeses using mid-infrared and fluorescence spectroscopies: A preliminary investigation. *International Dairy Journal*, 15, 275–286.
39. 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.
40. Liu, J.; Chen, J.; Dong, N.; Ming, J.; Zhao, G. (2012). Determination of degree of substitution of carboxymethyl starch by Fourier transform mid-infrared spectroscopy coupled with partial least squares. *Food Chemistry*, 132, 2224- 2230.
41. Lopez-Villalobos, N.; Spelman, R.J.; Melis, J.; Davis, S.R.; Berry, S.D.; Lehnert, K.; Holroyd, S.E.; MacGibbon, A.H.K and Snell, R.G. (2014). Estimation of genetic and crossbreeding parameters of fatty acid concentrations in milk fat predicted by mid-infrared spectroscopy in New Zealand dairy cattle. *Journal of Dairy Research*, 81, pp 340-349.
42. Lozano, M. (2013). Caracterización de la carne procedente de diferentes especies animales mediante espectroscopia MIR.
43. Luykx, D.M.A.M; van Ruth, S.M. (2008). An overview of analytical methods for determining the geographical origin of food products. *Food Chemistry*, 107, 897-911.
44. M. De Marchi, M. Penasa, A. Cecchinato, M. Mele, P. Secchiari and G. Bittante (2011). Effectiveness of mid-infrared spectroscopy to predict fatty acid composition of Brown Swiss bovine milk. *Animal*, 5, pp 1653-1658.
45. Mahesar, S. A.; Sherazi, S. T. H.; Kandhro, A. A.; Bhangar, M. I.; Khaskheli, A. R.; Talpur, M. Y. (2011). Evaluation of important fatty acid ratios in poultry feed lipids by ATR FTIR spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy*, 57(2), 177-181.
46. Mariey, L.; Signolle, J.P.; Travert, A.J. (2001). Discrimination, classification, identification of microorganisms using FTIR spectroscopy and chemometrics. *Vibrational Spectroscopy*, 26, 151-159.
47. Mataix, J. (2013). Nutrición para educadores.
48. McElhinney, J.; Downey, G.; O'Donnell, C. (1999). Quantitation of lamb content in mixtures with raw minced beef using visible, near and mid infrared spectroscopy. *Journal of Food Science*, 64, 587-591.

49. Meza-Márquez, O.G.; Gallardo-Velázquez, T.; Osorio-Revilla, G. (2010). Application of mid -infrared spectroscopy with multivariate analysis and soft independent modeling of class analogies (SIMCA) for the detection of adulterants in minced beef. *Meat Science*, 86, 511-519.
50. Mojonier, T.; Troy, H.C. (1925). The technical control of dairy products: a treatise on the testing, analyzing, standardizing and the manufacture of dairy products. Mojonier Bros. Co.
51. Naumann, D. (1984). Some ultrastructural information on intact, living bacterial cells and related cell-wall fragments as given by FTIR. *Infrared Physics*, 24, 233 – 238.
52. Organización Mundial de la Salud (2003). Dieta, nutrición y prevención de enfermedades crónicas.
53. Papadopoulou, O.; Panagou, E.Z.; Tassou, C.C.; Nychas, G.-J.E. (2011). Contribution of Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy data on the quantitative determination of minced pork meat spoilage. *Food Research International*, 44, 3264-3271.
54. Picque, D.; Cattenoz, T.; Corrieu, G.; Berger, J. L. (2005). Discrimination of red wines according to their geographical origin and vintage year by the use of mid-infrared spectroscopy. *Sciences des Aliments*, 25, 207–220.
55. Qiao, Y.; van Kempen, T. A. T. G. (2004). Technical note: Comparison of Raman, mid and near infrared spectroscopy for predicting the amino acid content in animals meals. *Journal of Animal Science*, 82, 2596-2600.
56. Ripoche, A.; Guillard, A.S. (2001). Determination of fatty acid composition of pork fat by Fourier transform infrared spectroscopy. *Meat Science* 58, 299-304.
57. Rohman, A.; Siswindari; Erwanto, Y.; Yaakob; Che Man, B. (2011). Analysis of pork adulteration in beef meatball using Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. *Meat Science*, 88, 91-95.
58. Ruiz, D.; Reich, M; Bureau, S; Renard, C.M.G.C.; Audergon, J-M. (2008). Application of Reflectance Colorimeter Measurements and Infrared Spectroscopy Methods to Rapid and Nondestructive Evaluation of Carotenoids Content in Apricot (*Prunus armeniaca* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 4916-4922.
59. Ruoff, K.; Luginbühl, W.; Kuünzli, R.; Iglesias, M. T.; Bogdanov, S.; Bosset, J.-O.; von Der Ohe, K.; Von Der Ohe, W.; Amadó, R. (2006). Authentication of the botanical and geographical origin of honey by mid-infrared spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 6873–6880.

60. Shiroma, C.; Rodriguez-Saona, L. (2009). Application of NIR and MIR spectroscopy in quality control of potato chips. *Journal of Food Composition and Analysis*, 22, 596-605.
61. Sivakesava, S.; Irudayaraj, J. (2002). Classification of simple and complex sugar adulterants in honey by mid-infrared spectroscopy. *International Journal of Food Science and Technology*, 37, 351-360.
62. Skoog, D. A., Holler, F. J., & Nieman, T. A. (2001). Principios de análisis instrumental.
63. Soxhlet, F. (1879). Die gewichtsanalytische Bestimmung des Milchfettes. *Dingler's Polytechnisches Journal*, 232, 461-465.
64. Sun, D-W. (2009). *Infrared Spectroscopy for Food Quality Analysis and Control*. Editorial Academic Press.
65. Tapp, H. S.; Defernez, M.; Kemsley, E. K. (2003). FTIR spectroscopy and multivariate analysis can distinguish the geographical origin of extra virgin olive oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 6110-6115.
66. Tewari, J.; Irudayaraj, J. (2004). Quantification of Saccharides in multiplefloral honeys using Fourier transform infrared microattenuated total reflectance spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 3237- 3243.
67. Vestergaard, M.; Madsen, N.T.; Bligaard, H.B.; Bredhal, L.; Rasmussen, P.T., Andersen. A. R. (2007). Consequences of two or four months of finishing feeding of culled dry dairy cows on carcass characteristics and technological and sensory meat quality. *Meat Science*, 76. 635-643.
68. Willard, H.H.; Merritt Jr., L.L.; Dean, J.A.; Settle Jr., F.A. (1988). *Instrumental Methods of Analysis* (7th edition). Wadsworth Publishing Company.
69. Wu, D.; Feng, S.; He, C.; He, Y. (2008). NIRS and MIRS technique for the determination of protein and fat content in milk powder. *Proceedings of SPIE*, 6625, 66251S1-66251S8.
70. Wu, D.; He, Y.; Shi, J., Shuijuan, F. (2009). Exploring Near and Midinfrared Spectroscopy to Predict Trace Iron and Zinc Contents in Powdered Milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 1697-1704.