

Universidad Pública de Navarra

Nafarroako Unibertsitate Publikoa

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR
DE INGENIEROS AGRÓNOMOS

*NEKAZARITZAKO INGENIARIEN
GOI MAILAKO ESKOLA TEKNIKOA*

CARACTERIZACIÓN DE LA CARNE PROCEDENTE DE
DIFERENTES ESPECIES ANIMALES MEDIANTE
ESPECTROSCOPIA MIR

presentado por

MARÍA LOZANO SAIZ-*k*

aurkeztua

INGENIERO AGRÓNOMO
NEKAZARITZA INGENIARITZA

Septiembre, 2013/ 2013ko Irailan

Dña. María José Beriain Apestegua, Catedrática del Área de Nutrición y Bromatología del Departamento de Ciencias del Medio Natural de la Universidad Pública de Navarra y D. Jesús Echeverría Morrás, Catedrático de Química Orgánica del Departamento de Química Aplicada de la Universidad Pública de Navarra.

CERTIFICAN QUE:

Dña. María Lozano Saiz 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 “Caracterización de la carne procedente de diferentes especies animales 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 Septiembre de 2013.

Fdo. María José Beriain Apesteguía

Fdo. Jesús Echeverría Morrás

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a las siguientes personas:

A M^o José, mi tutora durante este trabajo final de carrera, por estar siempre disponible en todo momento, haber creído que era capaz de llevar a cabo esta investigación y por toda la ayuda prestada en todos los aspectos durante los meses en los que hemos estado trabajando juntas.

A Jesús, por haber aceptado ser mi codirector, por haberme introducido en el mundo de la química orgánica y por la gran cantidad de conocimientos aportados. Gracias por compartir tu sabiduría conmigo y por tus sabios consejos.

Al equipo de “telecos”, en especial a Pablo y a Miguel, por mostrarme el mundo de la espectroscopia infrarroja, haberme dejado hacer uso de su equipo y por estar siempre disponible a resolver mis dudas. Gracias en especial a Pablo por toda la ayuda prestada durante el análisis de los datos y la obtención de los espectros.

A la Carnicería Manolo Mazo por habernos suministrado las muestras que hemos usado durante esta investigación.

A toda mi familia y en especial a mis padres, que me siguen apoyando incondicionalmente en todo momento. Y a mi hermano, Diego, que aunque separados por muchos kilómetros me sigue dando grandes consejos.

A todas mis amigas por preocuparse siempre por lo que estaba haciendo aunque realmente nunca lo llegaran a comprender. Y en especial a esas personas que han hecho más llevadera mi estancia veraniega en Pamplona, dándome ánimos cuando más los necesitaba.

Por último quiero agradecer a todas esas personas con las que me he cruzado a lo largo de los últimos años y que se han preocupado por mí.

MUCHAS GRACIAS A TODOS

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	1
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN	3
CAPÍTULO II. ANTECEDENTES	5
1. Características de la carne.	6
1.1. Tejido muscular.	6
1.2. Composición química de la carne.	10
1.2.1. Composición proteica.	11
1.2.2. Composición lipídica.	19
1.2.3. Otros componentes.....	23
1.2.4. Factores que influyen en la composición.	25
2. Métodos de medida de la composición química.....	27
2.1. Composición proteica.	28
2.1.1. Método de Kjeldahl.	28
2.1.2. Método de Biuret.	29
2.1.3. Método de Lowry.	30
2.1.4. Método del BCA (ácido bicinconínico).....	31
2.1.5. Método de Bradford.	31
2.1.6. Nefelometría y turbidimetría.....	31
2.1.7. Método de combustión directa o método Dumas.....	32
2.2. Composición lipídica.	32
2.2.1. Procedimientos de extracción.	33
2.2.2. Procedimientos volumétricos.	35
3. Espectroscopia de infrarrojo.	35
3.1. Fundamentos.....	37
3.2. Instrumentación.	39
3.2.1. Espectrofotómetros dispersivos de red.	39

3.2.2. Instrumentos basados en la transformada de Fourier.	42
3.3. Comparativa entre métodos FT-NIR y FT-MIR.	44
4. Aplicaciones y perspectivas de futuro del empleo de espectroscopia MIR en la evaluación de la calidad de los alimentos.....	45
4.1. Determinación de la composición química de los alimentos.....	46
4.2. Detección la presencia de bacterias en alimentos.	47
4.3. Determinación de la autenticidad de los alimentos.	49
4.4. Determinación del sistema de producción de los alimentos.....	50
4.5. Aplicaciones de MIR en el análisis de muestras de carne.	50
CAPÍTULO III. OBJETIVOS	54
CAPÍTULO IV. MATERIAL Y MÉTODOS.....	56
1. Diseño experimental.	57
2. Material animal.	58
3. Análisis de las muestras.	64
3.1. Conservación de las muestras.....	64
3.2. Composición química de la carne.	64
3.2.1. Determinación de humedad.	64
3.2.2. Determinación del contenido en grasa.	65
3.2.3. Determinación del contenido en proteína.....	67
3.3. Tratamiento y preparación de las muestras para análisis por FTIR.	68
3.3.1. Picado de las muestras.....	68
3.3.2. Preparación de las pastillas para los análisis de espectroscopia infrarroja.	69
3.4. Análisis mediante espectroscopia MIR.	73
4. Tratamiento estadístico de los datos.....	74
CAPÍTULO V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	76
1. Composición química de las muestras.	77

2. Adaptación del método analítico para análisis de muestras de carne mediante FTIR. Puesta a punto.	83
3. Asignación de las bandas representativas de los espectros FTIR de las carnes.....	85
4. Estimación de la composición química de las muestras.....	100
4.1. Estimación del contenido lipídico de las muestras.....	100
4.2. Estimación del contenido proteico de las muestras.....	104
5. Empleo del Análisis de Componentes Principales (ACP) para la clasificación de las muestras por especies animales.....	107
CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES.....	112
CAPÍTULO VII. BIBLIOGRAFÍA.....	114

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición química media de diferentes especies.	11
Tabla 2. Estructura covalente y abreviatura de los aminoácidos.	12
Tabla 3. Composición en ácidos grasos de los triglicéridos integrantes de las grasas de algunas especies animales más ampliamente consumidas.	26
Tabla 4. Aplicación de espectroscopia MIR en productos cárnicos.	52
Tabla 5. Número total de muestras utilizadas de cada tipo animal.	58
Tabla 6. Composición química de diversas especies.	78
Tabla 7. Media, desviación típica y desviación típica relativa de humedad, proteína y grasa de algunas especies animales.	79
Tabla 8. Composición química muestras de carne de potro.	82
Tabla 9. Composición química muestras de carne de toro de lidia.	82
Tabla 10. Media, desviación típica y desviación típica relativa de los espectros de las muestras de cordero.	85
Tabla 11. Asociación de las longitudes de onda con los grupos funcionales.	87
Tabla 12. Coeficientes de correlación de la variación de absorbancia de las bandas más relevantes de los espectros FTIR para las distintas muestras de carne.	92
Tabla 13. Coeficientes de correlación de la variación de absorbancia de las bandas más relevantes de los espectros FTIR para las distintas muestras de carne, incluyendo la composición química.	96
Tabla 14. Coeficientes de correlación de la variación de absorbancia de las bandas más relevantes de los espectros FTIR para las distintas muestras de carne (excepto la muestras de carne de potro), incluyendo la composición química.	98
Tabla 15. Coeficientes de correlación de la variación de absorbancia de las bandas más relevantes de los espectros FTIR para las distintas muestras de	

carne (excepto la muestras de carne de potro y toro), incluyendo la composición química.....	99
Tabla 16. Resultados del análisis de validación del método.....	103
Tabla 17. Números de onda cuyas intensidades de absorción son utilizadas para la realización del Análisis de Componentes Principales (ACP).	108
Tabla 18. Especie animal, código asignado y número de muestras utilizadas.	109
Tabla 19. Porcentaje de variabilidad explicado por los cuatro primeros componentes principales.	109

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del músculo estriado	8
Figura 2. Composición y aspecto que tendría la micrografía electrónica de una sección longitudinal de músculo estriado.....	10
Figura 3. Estructura primaria de las proteínas.....	14
Figura 4. Estructura secundaria de las proteínas: hélice α (superior) y en hoja plegada o estructura β (inferior).....	15
Figura 5. Estructura terciaria de las proteínas.....	16
Figura 6. Estructura cuaternaria de las proteínas.	16
Figura 7. Estructura molecular de la miosina.....	17
Figura 8. Estructura en doble hélice de la actina.....	18
Figura 9. Estructura molecular de los ácidos grasos saturados e insaturados. ...	20
Figura 10. Estructura molecular del glicerol y los triglicéridos.	21
Figura 11. Estructura molecular simplificada de los fosfolípidos.	21
Figura 12. Estructura molecular de un fosfolípidos, su estructura simplificada y su disposición para la formación de las membranas celulares.	22
Figura 13. Espectro electromagnético	36
Figura 14. Oscilaciones moleculares distintas de flexión.....	38
Figura 15. Disposición de los elementos en espectroscopia óptica de absorción	39
Figura 16. Esquema interior de un espectrofotómetro basado en la transformada de Fourier.....	43
Figura 17. Interferograma de una fuente y su espectro correspondiente.....	43
Figura 18. Sistema para extracción de grasa.....	66
Figura 19. Picadora Sola Quick Mix (Mod N202, 500 W).	69
Figura 20. Estado de la muestra tras el picado.....	69

Figura 21. Estado de la muestra antes de su homogeneización con el mortero de agata.....	70
Figura 22. Estado de la muestras tras su homogeneización.....	70
Figura 23. Troquel para prensa hidráulica.....	71
Figura 24. Prensa hidráulica manual.....	71
Figura 25. Estufa Holelab.....	72
Figura 26. Desecador.....	72
Figura 27. Equipo FT-IR Vertex 80v.....	73
Figura 28. Soporte para la colocación de las pastillas durante su medida.....	74
Figura 29. Espectro de muestras de 2 y 6 mg de carne de pavo (P) y pechuga de pollo (PP).....	83
Figura 30. Espectros de las repeticiones de unas muestras de cordero.....	84
Figura 31. Espectro FTIR de 5 muestras de carne: cerdo (C2a), pavo (P2a), cordero (CO2a), pollo (PP2a) y ternera (T2a).....	86
Figura 32. Espectros FTIR normalizados de grasa de potro (GPT2a) y de proteína (A1a).....	89
Figura 33. Espectro FTIR normalizados de muestras de grasa (GPT2a), proteína (A1a) y carne de ternera (T2a).....	90
Figura 34. Espectro FTIR de una muestra de cerdo con la asociación de los enlaces con las bandas de absorción.....	94
Figura 35. Recta de regresión de la absorbancia de radiación infrarroja a 2925 cm^{-1} en función del porcentaje de materia grasa de las muestras de carne.....	101
Figura 36. Recta de regresión de la absorbancia de radiación infrarroja a 1744 cm^{-1} en función del porcentaje de materia grasa de las muestras de carne.....	101
Figura 37. Recta de regresión de la absorbancia de radiación infrarroja a 3288 cm^{-1} en función del porcentaje de proteína de las muestras de carne.....	105
Figura 38. Recta de regresión de la absorbancia de radiación infrarroja a 1657 cm^{-1} en función del porcentaje de proteína de las muestras de carne.....	106
Figura 39. Recta de regresión de la absorbancia de radiación infrarroja a 1542 cm^{-1} en función del porcentaje de proteína de las muestras.....	106

Figura 40. Representación de las puntuaciones de los dos primeros componentes principales para cada una de las muestras analizadas. 110

RESUMEN

En el presente trabajo final de carrera se ha estudiado la aplicación de la espectroscopia infrarroja FTIR-MIR para el análisis de muestras de carne y para la estimación de su contenido lipídico y proteico.

Se ha procedido a la puesta a punto de la metodología para el análisis de las muestras mediante un espectrofotómetro basado en la transformada de Fourier. Para ello, se utilizaron un total de 33 muestras procedentes de diferentes especies animales entre las que se incluyen cerdo, cordero, potro, conejo, ternera, vaca, toro, pollo, pavo y gallina.

En cuanto a la metodología de trabajo seguida, se prepararon pastillas mezclando las muestras de carne picadas con bromuro potásico (KBr). Tras ello, las mezclas se homogeneizaron y se compactaron con una prensa hidráulica manual. De cada una de las muestras se realizaron dos repeticiones.

Una vez obtenidos los espectros de absorbancia, se procedió al tratamiento analítico de los datos. En primer lugar, se identificaron los picos de absorbancia más característicos de las muestras y se asignaron las vibraciones de los enlaces. Una vez identificados, se relacionaron con el contenido lipídico y proteico de las muestras con el fin de establecer un método para su estimación.

En conclusión, los resultados obtenidos permiten establecer la espectroscopía FTIR-MIR como método de análisis de muestras de carne obteniendo espectros con bandas bien resueltas y sin ruido. Además, se consiguió relacionar algunas bandas con el contenido proteico (3288 , 1657 y 1542 cm^{-1}) y lipídico (2925 , 2854 y 1746 cm^{-1}) de la carne. Se observó que las muestras de carne tenían un contenido similar de proteína y humedad, pero su contenido lipídico era muy variable, inclusive dentro de una misma especie. Por último, se estableció y validó un método para la estimación del contenido lipídico de las muestras de carne.

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

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

Un parámetro importante a controlar en la producción de carne, es el contenido en proteína y grasa que presenta cada tipo de animal. Actualmente, el contenido en proteína de una muestra se analiza normalmente mediante el método Kjeldahl (1883), ya que es el método oficial de referencia. Sin embargo, este método presenta una serie de inconvenientes ya que es largo de realizar y medioambientalmente no sostenible. El análisis del contenido en grasa de una muestra se puede llevar a cabo por diferentes métodos entre los se encuentran el método Soxhlet de extracción (1879), el método Babcock (1890), el método Gerber (1891) o la cromatografía de gases. Sin embargo, todos estos métodos presentan una serie de inconvenientes ya que son largos de realizar, complejos e implican la destrucción de las muestras (Wu, D. *et al.*, 2008).

Por todo ello, se ha decidido buscar métodos alternativos para el análisis de la composición química de la carne. Entre estos métodos se encuentran las técnicas de espectroscopia de infrarrojo medio. Estas técnicas ofrecen rapidez en el análisis, la no destrucción de las muestras y son medioambientalmente sostenibles ya que no emplean ningún reactivo peligroso para el medioambiente (Wu, D. *et al.*, 2008).

En este sentido, en el presente trabajo final de carrera se va establecer un método para el análisis de muestra de carne mediante espectroscopia FTIR-MIR y buscar su posible aplicación en el análisis de la composición química de las muestras. Los resultados obtenidos van a ser presentados en la reunión COST “FAIM II: Second Annual Conference on Carcass Evaluation, Meat Quality, Software and Traceability”. Universidad de Kaposvár. Hungría. (29 y 30 de Octubre de 2013).

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 concatenada de procesos fisicoquímicos y bioquímicos, que se desarrollan como consecuencia del sacrificio del animal. Por otro lado, la canal es considerada como 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 considerada (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. El tejido adiposo contribuye a exaltar ciertas cualidades de la carne.

1.1. *Tejido muscular.*

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

Un músculo se compone de un conjunto heterogéneo de fibras musculares, agrupadas en haces, cada una de las cuales consiste en una célula polinucleada de varios centímetros de longitud, aunque de estrecho diámetro, cuya magnitud puede variar entre 0,1 y 0,01 μm . Desde hace muchos años se sabe que no todas las fibras musculares son idénticas y además, existen diferentes clasificaciones en función del criterio aplicado. Entre las más comunes se encuentran la clasificación en función de la velocidad de contracción, determinada por la actividad ATPásica de la miosina, del metabolismo energético o de las diferencias bioquímicas e histológicas. Éste último criterio es el más utilizado y permite clasificar las fibras musculares en fibras rojas βR , que presentan contracción lenta y metabolismo oxidativo; fibras blancas αW , que exhiben contracción rápida y metabolismo glucolítico; y fibras rojas αR , que tienen contracción rápida y metabolismo intermedio.

De acuerdo con las proporciones alcanzadas en el músculo por cada uno de estos tipos de fibras, se suele hacer referencia a tres tipos de músculos. Los músculos rojos que están compuestos principalmente por fibras βR y αR , siendo por lo tanto, tanto de contracción rápida como de contracción lenta. Poseen una gran cantidad de mitocondrias, mioglobina y lípidos. En estas células, la energía se obtiene mediante el metabolismo aerobio que degrada la glucosa por la vía oxidativa, con participación del ciclo de Krebs y generación de moléculas de ATP. Generalmente son más coloreados por su abundante irrigación sanguínea y tienen un pH más elevado que los músculos blancos, así como una mejor capacidad de retención de agua. Los músculos blancos que se encuentran integrados por una elevada proporción de fibras αW , lo que determina su contracción rápida. Son pobres en mitocondrias, mioglobina y lípidos. El catabolismo de la glucosa se lleva a cabo en estas células por vía anaerobia mediante glicolisis anaerobia formándose lactato en el proceso. Su longitud es la mitad de las anteriores y tienen poco riego sanguíneo lo que determina su color más claro. Y los músculos de carácter intermedio que tienen características comunes a los dos anteriores.

Otra manera de clasificar los músculos es según su enervación, pudiendo distinguir los músculos lisos de contracción involuntaria y los músculos estriados de contracción voluntaria. Los músculos estriados cuando son observados al microscopio óptico presentan el aspecto que da origen a su nombre y constituyen lo que se conoce como carne. Generalmente, son los responsables del movimiento y se fijan al tejido óseo, mediante aponeurosis y tendones.

El músculo estriado está integrado por cinco elementos considerados esenciales por la función que desempeñan en él: (i) numerosas fibras musculares, que pueden considerarse las unidades estructurales diferenciadas, esenciales o básicas, y que suelen estar organizadas en haces de fibras individuales o células sencillas; (ii) el tejido conectivo asociado, que aporta el correspondiente soporte al tejido muscular en sus distintos niveles; (iii) el tejido adiposo, en forma de grasa intramuscular; (iv) las moléculas de hidratos de carbono; y (v) las moléculas de agua, que pueden encontrarse en diferentes formas.

Tal y como se observa en la Figura 1, las fibras musculares se encuentran rodeadas por una membrana excitable eléctricamente denominada sarcolema. Mediante el sarcolema, las fibras musculares se unen o conectan al tejido conectivo, a través del cual el músculo ejerce su tracción. Una fibra, a su vez, está formada por muchas miofibrillas paralelas que son elementos polinucleados que están formados por ribosomas, complejos de Golgi, mitocondrias y lisosomas. Éstas se encuentran sumergidas en el sarcoplasma, que es el fluido intracelular donde se encuentran los orgánulos formados por proteínas con actividad enzimática (mitocondrias, peroxisomas y lisosomas), núcleos, aparato de Golgi, cuerpos lipídicos y numerosas sustancias que se encuentran en suspensión acuosa como pueden ser péptidos, aminoácidos libres y sobre todo mioglobina. Estos componentes pueden tener funciones muy diversas, algunas de gran transcendencia para las propiedades posteriores de la carne.

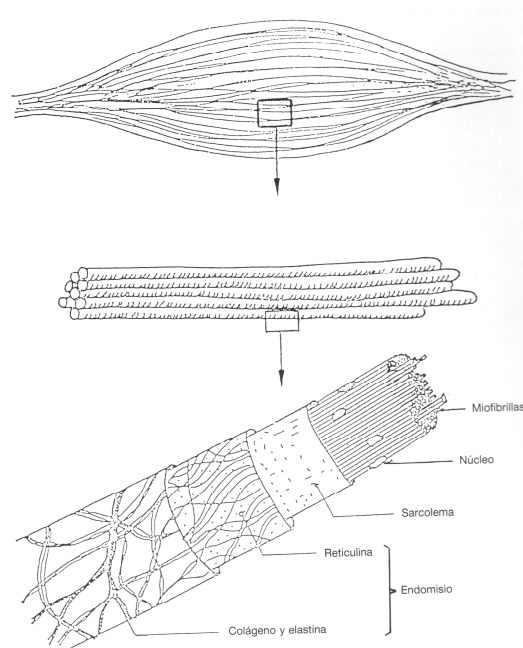


Figura 1. Estructura del músculo estriado (Fuente: López de Torre, G. y Carballo, B. M., 1991).

Las miofibrillas constituyen el aparato contráctil del músculo y están formadas mayoritariamente por dos proteínas, miosina y actina, que junto con otras permiten que el músculo realice esta función. Las miofibrillas comprenden diversos filamentos proteicos que hacen posible su clasificación en filamentos

gruesos, formados principalmente por miosina y filamentos delgados, compuestos mayoritariamente por actina.

Las miofibrillas se organizan alternando bandas, presentando una estructura considerada responsable del aspecto estriado tan característico del músculo esquelético. Cada filamento grueso se encuentra rodeado por seis filamentos delgados, formando una matriz hexagonal que, además, se acompaña de unas estriaciones transversales motivadas por la alternancia regular de dos tipos de bandas (Figura 2). Las bandas oscuras, anisótropas o bandas A, formadas por filamentos gruesos, cuyos extremos están más o menos solapados con los filamentos delgados. Su zona central, o zona H, está integrada exclusivamente por filamentos gruesos, al no existir en ella solapamientos con los filamentos delgados, por lo que resulta menos densa y de apariencia más clara. El tamaño de estas zonas H se considera un factor importante para determinar la capacidad del músculo para retener agua. Por otro lado, las bandas claras, isótropas o bandas I, cuya escasa densidad les aporta menor oscuridad, presentan en su parte central una zona estrecha y muy densa, denominada disco Z. Cada banda I está formada solamente por filamentos delgados, que son compartidos por dos sarcómeros contiguos y se ensamblan entre sí a través del disco Z.

Durante la contracción el músculo, éste se acorta hasta un tercio de su longitud debido a que los filamentos gruesos y finos se deslizan unos sobre otros, sin variar su longitud, pero aumentando el solapamiento.

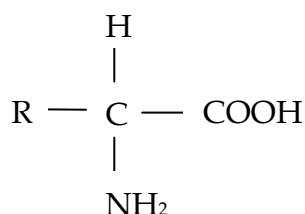
Tabla 1. Composición química media de diferentes especies.

Animal	Humedad	Proteína	Lípidos	Cenizas
Pavo (pechuga)	73,5	23,9	1,0	1,2
Avestruz (magro)	74,2	22,9	1,1	1,2
Pollo (pechuga)	73,8	21,9	3,0	1,1
Canguro (magro)	75,1	21,8	1,2	1,0
Liebre	73,3	21,6	3,0	1,2
Jabalí	74,0	21,4	9,3	1,1
Venado	75,7	21,4	1,3	1,0
Conejo doméstico	74,0	21,2	3,5	1,1
Cerdo (magro)	71,2	21,0	7,6	1,0
Conejo de monte	74,6	20,8	2,6	1,1
Pollo (muslo)	72,7	20,6	5,6	1,1
Pavo (muslo)	74,7	20,5	3,6	1,1
Cabrito	74,3	19,4	4,8	0,9
Ternera (solomillo)	77,2	19,3	2,0	1,1
Pato (pechuga)	63,5	18,0	17,2	1,0
Añojo (solomillo)	81,1	14,3	4,6	1,2
Cordero (pierna)	76,6	10,6	10,8	1,1

Fuente: Hernandez Gil, A. *Tratado de nutrición. Composición y Calidad Nutritiva De Los Alimento. Volumen 2.* Editorial Panamericana. Madrid, España. 2010.

1.2.1. Composición proteica.

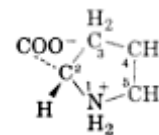
Las proteínas son macromoléculas formadas por cadenas de 20 diferentes aminoácidos (Tabla 2), unidos entre sí por medio de enlaces peptídicos, encontrándose como mezclas complejas en los tejidos orgánicos. Los aminoácidos son monómeros formados por un grupo amino primario (-NH₂) y un grupo carboxilo (-COOH), con la siguiente estructura:



Siendo R una cadena lateral característica, de composición variable, que permite diferenciar a los diferentes aminoácidos y que influye en las propiedades fisicoquímicas de los mismos y por lo tanto, de las proteínas de las que forma

parte. Estas variaciones hacen que las proteínas posean propiedades y características que las diferencian unas de otras. Entre las propiedades más importantes de las proteínas se encuentran la solubilidad, el punto isoeléctrico, la desnaturalización, la solvatación o hidratación, la densidad y el comportamiento en presencia de sales.

Tabla 2. Estructura covalente y abreviatura de los aminoácidos.

Nombre	Símbolo de tres letras	Símbolo de una letra	Fórmula estructural
<i>Aminoácidos de cadenas laterales apolares</i>			
Glicina	Gly	G	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$
Alanina	Ala	A	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{CH}_3 \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$
Valina	Val	V	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{CH} \\ \quad \\ \text{NH}_3^+ \quad \text{CH}_3 \end{array}$
Leucina	Leu	L	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH} \\ \quad \quad \\ \text{NH}_3^+ \quad \quad \text{CH}_3 \end{array}$
Isoleucina	Ile	I	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \quad \text{CH}_3 \\ \quad \quad \\ \text{H}-\text{C}-\text{C}^2-\text{CH}_2-\text{CH}_3 \\ \quad \quad \\ \text{NH}_3^+ \quad \quad \text{H} \end{array}$
Metionina	Met	M	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_3 \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$
Prolina	Pro	P	
Fenilalanina	Phe	F	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5 \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$
Triptófano	Trp	W	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{C}_8\text{H}_6\text{N} \\ \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$

Las proteínas tienen diversas funciones en los procesos biológicos. Como enzimas catalizan el conjunto de reacciones químicas que tienen lugar en los organismos, actuando como reguladoras directas de las mismas y de manera indirecta, como mensajeras químicas conocidos como hormonas. Además, intervienen en el transporte y almacenamiento de sustancias claves en los procesos biológicos, como los iones metálicos, el oxígeno, la glucosa, los lípidos y muchas otras moléculas. Igualmente, las proteínas generan el movimiento mecánico coordinado de muchos procesos biológicos cuando se encuentran en forma de fibras musculares. También participan en el sistema inmune que constituye un sistema esencial de defensa biológica en los animales superiores. Por otro lado, las proteínas pueden cumplir un papel pasivo, como en el caso del colágeno, que brinda la fuerza característica de tensión a huesos, tendones y ligamentos.

Las funciones de las proteínas pueden comprenderse mejor en función de sus estructuras, esto es, de las relaciones tridimensionales de los átomos que las componen. Tradicionalmente, estas estructuras se describen en términos de cuatro niveles de organización que son las siguientes:

- a) Estructura primaria (Figura 3): es la secuencia de aminoácidos unidos por enlaces covalentes, denominados enlaces peptídicos. Las cadenas proteicas más cortas conocidas contiene entre 20 y 100 aminoácidos, aunque la mayor parte de las proteínas poseen entre 100 y 500. Algunas cadenas pueden llegar a tener miles de aminoácidos.

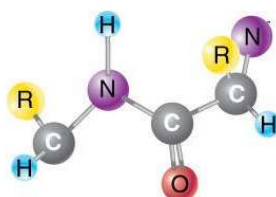


Figura 3. Estructura primaria de las proteínas.

- b) Estructura secundaria (Figura 4): es la disposición espacial adoptada por la cadena polipeptídica a lo largo de su eje. Dado que los sustituyentes de los carbonos α pueden rotar en torno a los ejes constituidos por los enlaces covalentes simples, la conformación que

puede adoptar la cadena polipeptídica puede ser muy variable. Sin embargo, cada cadena polipeptídica asume una conformación específica, llamada nativa. Las principales estructuras secundarias halladas en las proteínas son la hélice α y la estructura β .

La hélice α es una estructura ordenada que contiene 3,6 restos de aminoácidos por vuelta. Las cadenas laterales se proyectan al exterior de la hélice. En ella, se establecen múltiples enlaces de hidrógeno, especialmente entre el hidrógeno del grupo (-NH-CO-) y el oxígeno de un enlace peptídico localizado en la vuelta siguiente. Este tipo de estructura es muy estable ya que ofrece una alta densidad que restringe las interacciones con otras moléculas.

La estructura β es una estructura en zig-zag más estirada que la hélice α . Si se produce la supresión de los puentes de hidrógeno intracatenarios puede producirse el paso de las estructuras α helicoidales a estructuras β . Estas cadenas estiradas (β) se combinan para formar estructuras denominadas en hoja plegada que se encuentran unidas entre sí por puentes de hidrógeno intercatenarios, en los que todos los enlaces peptídicos participan en su formación. Las cadenas laterales (R) de los aminoácidos se sitúan por encima y por debajo del plano de las láminas y ni sus cargas ni las restricciones estéricas limitan la existencia de estas estructuras.

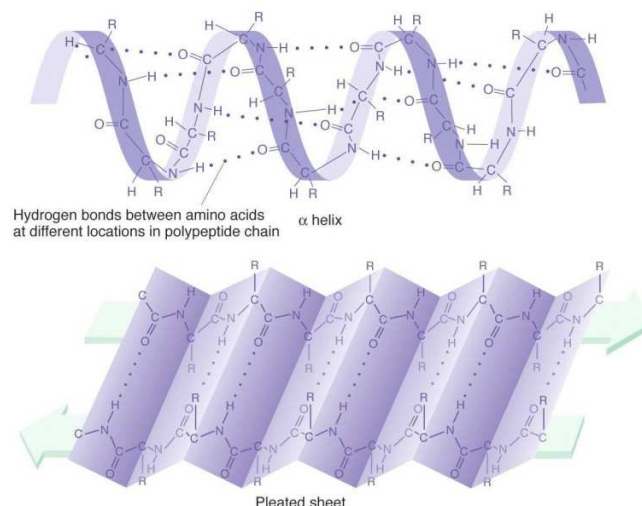


Figura 4. Estructura secundaria de las proteínas: hélice α (superior) y en hoja plegada o estructura β (inferior).

- c) Estructura terciaria (Figura 5): hace referencia a la organización tridimensional de una cadena polipeptídica que contiene regiones con estructuras secundarias bien y mal definidas. Aunque se conocen bien las estructuras terciarias de numerosas proteínas, resulta difícil representarlas de una forma simple.

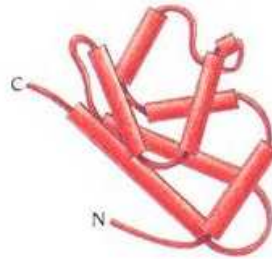


Figura 5. Estructura terciaria de las proteínas.

- d) Estructura cuaternaria (Figura 6): es el resultado de asociaciones no covalentes de unidades proteicas. Las fuerzas o enlaces que estabilizan las estructuras cuaternarias son idénticas a las que estabilizan las estructuras terciarias. Un ejemplo de estructura cuaternaria es la unión de la actina con la miosina en el músculo.

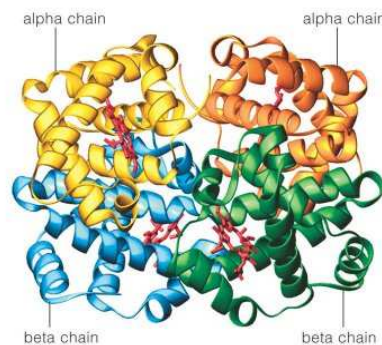


Figura 6. Estructura cuaternaria de las proteínas.

En los músculos existen dos grupos de proteínas que difieren tanto en su localización como en su función: las intracelulares (17-18 %) y las extracelulares (10-15 %). Las proteínas intracelulares se clasifican en sarcoplasmáticas, miofibrilares y citoesqueléticas.

Las proteínas sarcoplasmáticas representan en torno al 30-35 % del total de las proteínas del músculo. Desempeñan papeles importantes en los procesos metabólicos celulares ya que dan lugar a enzimas, pigmentos o estructuras integrantes de orgánulos celulares. Entre todas ellas destaca la mioglobina que, además de tener la función biológica de almacenar oxígeno en el músculo *in vivo*, presenta el interés de ser el pigmento responsable del color de la carne cuyo nivel depende de factores tanto intrínsecos como extrínsecos, entre los que se encuentran la alimentación o la selección genética. Se trata de una heteroproteína cuya estructura está formada por una proteína globina y grupo prostético hemo, caracterizado por un núcleo integrado por cuatro anillos de pirrol coordinados con un átomo central de hierro, que puede encontrarse en cualquiera de sus estados reducido u oxidado. Normalmente, predomina la forma ferrosa lo que hace que sea capaz de combinarse con gases como el oxígeno o el óxido nítrico. En este grupo también se incluyen las enzimas endógenas del tejido muscular. Algunas de ellas, como las calpaínas o las catepsinas, son responsables de las modificaciones percibidas en las estructuras intracelulares relacionadas con la resolución del rigor mortis y el ablandamiento de la carne.

Aunque las proteínas miofibrilares pueden desempeñar diversas funciones dentro de la fisiología muscular, cabe destacar la función contráctil, como ocurre con la miosina y la actina, y las funciones reguladoras. La miosina es la principal proteína de los filamentos gruesos que constituye el 50-60 % de las proteínas contráctiles miofibrilares. Es una molécula proteica muy larga que contiene dos cadenas polipeptídicas idénticas dotadas de un alto contenido de estructura alfa helicoidal. Las dos cadenas se encuentran enrolladas una sobre la otra, formando una superhélice. La molécula tiene dos cabezas globulares que son responsables de su actividad enzimática (ATPasa) y de su capacidad para interactuar con la actina (Figura 7).

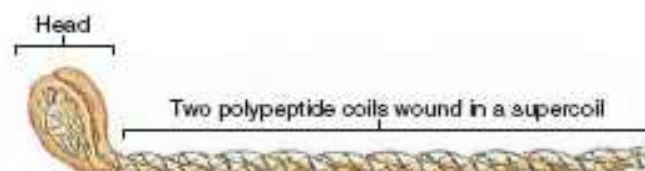


Figura 7. Estructura molecular de la miosina.

Por otro lado, la actina es la proteína más importante de los filamentos delgados, y constituye el 15-30 % de las proteínas miofibrilares del músculo. La actina está fijada a la estructura del músculo con mucha mayor firmeza que la miosina y se suele presentar con una estructura helicoidal doble denominada actina fibrilar o F-actina (Figura 8).

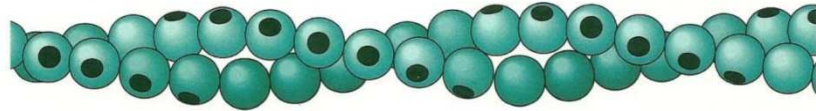


Figura 8. Estructura en doble hélice de la actina.

Por último, las proteínas del citoesqueleto se encuentran situadas en los filamentos elásticos y están formadas principalmente por conectina. El citoesqueleto se trata de un complejo proteico que forma parte de los denominados filamentos *gap*, o filamentos huecos, de la estructura citoesquelética. Son unos filamentos que, arrancando de la zona A del sarcómero, se extienden hasta el disco Z. Parece que dicho complejo proteico está presente en todas las partes del sarcómero y posiblemente desempeñe un papel crucial en el mantenimiento de su ordenada organización, así como que participe de su elasticidad. A lo largo de su cadena aminoacídica, posee diversos centros de unión con otras proteínas del mismo y se supone que enlaza con los filamentos de miosina a través de su lado terminal carboxílico. Las proteínas del citoesqueleto se localizan dentro y alrededor de las miofibrillas. Se piensa que podrían desempeñar cierto papel en la calidad de la carne, particularmente en su dureza o blandura.

Las proteínas extracelulares son proteínas insolubles que integran el estroma o tejido conectivo. Se sabe que el tejido conectivo se estructura sobre la base de una sustancia amorfa, que aglutina elementos organizados en forma de varios tipos de fibras extracelulares, según la naturaleza de la proteína que las integre, pudiendo ser colágeno, inextensibles y no ramificados; o elastina y reticulina, ramificadas y elásticas. El colágeno es la proteína mayoritaria del tejido conectivo de la carne y desempeña un papel relevante en la textura de las carnes, haciéndolas más o menos comestibles. Se caracteriza por disponer de una estructura primaria peculiar, en la que se repite la siguiente secuencia

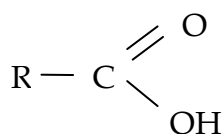
aminoacídica: glicina-prolina-hidroxiprolina-glicina-otro aminoácido. Se corresponde con una de las pocas proteínas que contienen un elevado porcentaje de hidroxiprolina, un aminoácido poco frecuente en otras proteínas, además de presentar un predominio del aminoácido glicina. Cuanto más elevado sea el porcentaje de estos aminoácidos en la molécula de colágeno, mayores serán su rigidez y su resistencia.

1.2.2. 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. Dado que la definición de estos elementos tiene como base común la solubilidad en una serie de sustancias, se incluyen en el grupo de los lípidos algunos compuestos de naturaleza química diversa. Sin embargo, el factor común estructural 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. Esta característica determina que las moléculas sean en mayor o menor grado apolares y posean por ello las propiedades de solubilidad que las caracterizan.

Tal vez la función más importante de los lípidos se relaciona con el hecho de que un buen número de ellos son moléculas apolares que en presencia de agua se asocian formando capas, sirviendo de base para la organización de la estructura de las membranas celulares. Otros tipos representan reservas energéticas de gran capacidad. En parte, porque la grasa se puede almacenar en cantidades enormes, y en parte, porque su alto valor calórico. En los organismos superiores, las grasas se acumulan principalmente bajo la piel, sirviendo como aislantes contra los traumatismos y los cambios de temperatura. También es conveniente recordar que algunas hormonas y vitaminas pertenecen al grupo de los lípidos.

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



Donde R representa una cadena de átomos de carbono e hidrógeno más o menos compleja. Dado que todos los ácidos grasos tienen un grupo carboxilo, se distinguen unos de otros por la cadena de átomos de carbono, principalmente por el número de estos que posean. Los ácidos grasos con 16 o 18 átomos de carbono son los que se encuentran frecuentemente en los lípidos. Otra forma de distinguir los ácidos grasos es por la presencia o no de dobles enlaces en la cadena, permitiendo la clasificación de los ácidos grasos en saturados o insaturados (Figura 9). Los saturados son aquellos que no presentan dobles enlaces en su cadena mientras que los insaturados presentan al menos un doble enlace en la misma. Los dobles enlaces de los ácidos grasos casi siempre presentan una configuración *cis*, lo que impone un ángulo rígido de 30° en la cadena hidrocarbonada que interfiere con su empaquetamiento.

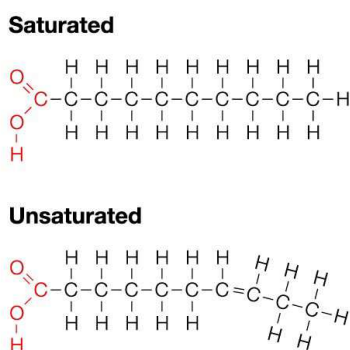


Figura 9. Estructura molecular de los ácidos grasos saturados e insaturados.

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

- Saturados: mirístico (C14:0), palmítico (C16:0) o esteárico (C18:0).
- Monoinsaturados: oleico (C18:1) y palmítoleico (16:1).
- Poliinsaturados: linoleico (C18:2), linolénico (C18:3) y araquidónico (C20:4).

Las grasas que aparecen en los animales son principalmente mezclas de triglicéridos o grasas neutras. Estas sustancias no polares e insolubles en agua son triésteres de ácidos grasos de glicerol (Figura 10).

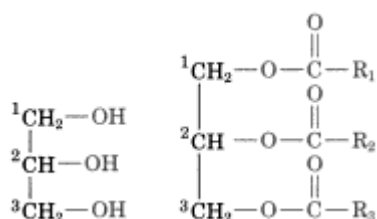


Figura 10. Estructura molecular del glicerol y los triglicéridos.

Los triglicéridos difieren según la identidad y el lugar de sus tres residuos de ácidos grasos. Los denominados triglicéridos simples contienen un tipo de residuo de ácido graso mientras que los triglicéridos mixtos más comunes contienen dos o tres tipos diferentes de residuos de ácidos grasos y se denominan en concordancia con su ubicación en la porción glicerol.

En los depósitos grasos también se pueden encontrar fosfolípidos o fosfoglicéridos aunque aparecen en pequeñas cantidades. Estos elementos forman parte casi exclusivamente de las membranas celulares debido a su naturaleza alifílica. Los fosfolípidos tienen cierto parecido estructural con las grasas neutras ya que están compuestos por una molécula de glicerol que tienen dos moléculas de ácidos grasos esterificadas (Figura 11). En el lugar del tercer ácido graso se encuentra una molécula de ácido fosfórico. Ésta, a su vez, también tiene unida, por un enlace de tipo éster, una molécula orgánica que varía de unos a otros fosfolípidos.

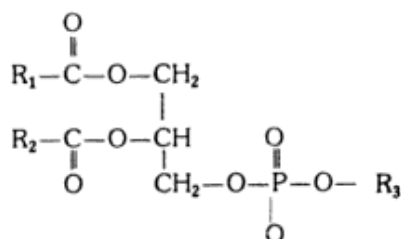


Figura 11. Estructura molecular simplificada de los fosfolípidos.

La porción de la molécula formada por el glicerol, los ácidos grasos y el ácido fosfórico, recibe el nombre de ácido fosfatídico. Si se rompen los enlaces de esta molécula por hidrólisis, se pueden obtener una molécula de glicerol, un ácido graso y un ácido fosfórico.

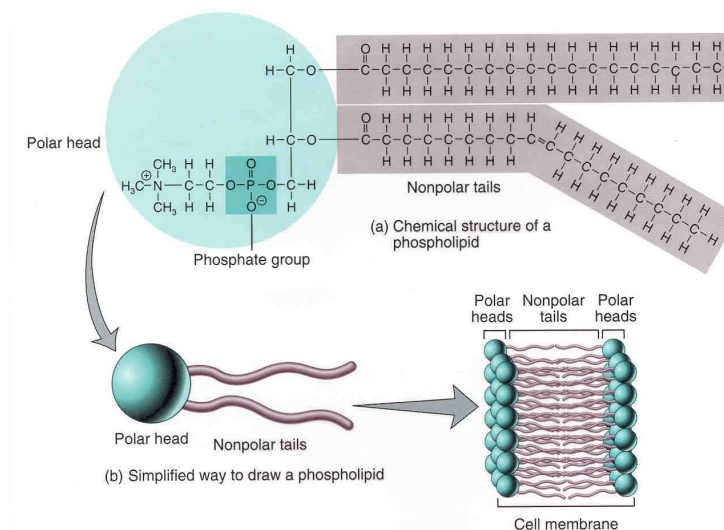


Figura 12. Estructura molecular de un fosfolípido, su estructura simplificada y su disposición para la formación de las membranas celulares.

Los fosfolípidos deben su naturaleza anfipática al hecho de que poseen una zona polar, representada por el glicerol, el ácido fosfórico y la otra molécula, y una zona apolar, constituida por las cadenas de átomo de carbono (Figura 12). En este tipo de estructuras, la porción apolar es rechazada y la porción polar es atraída por el agua, lo que favorece la formación de las estructuras denominadas como bicapa, que es la trama esencial en la cual se colocan los integrantes de las membranas celulares, intercalados entre las moléculas de fosfolípidos.

Después de las proteínas, los lípidos son los componentes mayoritarios presentes en las carnes predominando los ácidos grasos, libres y esterificados. Estos ácidos grasos presentan cadenas de entre 2 y 30 carbonos, saturados y no saturados en forma *cis*, pudiendo estar esterificados con glicerina, como los triglicéridos (más abundantes), diglicéridos y monoglicéridos.

Generalmente, las canales de los animales suelen contener un elevado porcentaje de compuestos grasos distribuidos en cuatro grupos. En primer lugar, podemos encontrar depósitos grasos en las cavidades corporales torácica, abdominal y pélvica. También se pueden encontrar como depósito subcutáneo, denominado grasa de cobertura, que está integrado por lípidos, una trama proteica y algo de agua, cuya cantidad y composición puede variar tanto con la raza como con la edad del animal. Su consistencia depende tanto de los ácidos

grasos integrantes de la composición química de la grasa como del desarrollo adquirido por su tejido conectivo. Aunque los dos depósitos que presentan mayor interés son la grasa intermuscular y los lípidos intramusculares. La grasa intermuscular se encuentra separando los distintos paquetes musculares y los aísla de los tabiques de tejido conectivo situado entre los músculos individuales. Los lípidos intramusculares son la grasa depositada en el interior de los músculos, en situación muy próxima a los vasos sanguíneos y entre las redes de los tabiques de tejido conectivo perimisial. En la práctica, también se la conoce con los nombres de veteado, jaspeado o marmorización, porque forma vetas visibles de grasa de color blanco, proporcionando al músculo un aspecto marmóreo que contrasta con el color rojo de la carne curada. Según el músculo analizado, se presentan una gran variabilidad en los niveles de lípidos intramusculares.

Cada uno de estos depósitos desempeña un continuo e importante papel en el metabolismo energético. Aparte de este papel fisiológico, la distribución de la grasa y el contenido relativo de varios ácidos grasos pueden adquirir importancia en relación con factores de palatabilidad.

1.2.3. Otros componentes.

Los hidratos de carbono suelen constituir entre el 1 % y el 2 % de la masa muscular del animal vivo, representados principalmente por el glucógeno, un polisacárido de reserva. No obstante, en la carne obtenida después del sacrificio del animal se producen cambios muy significativos como consecuencia de la actividad metabólica del tejido muscular. Al final del proceso de maduración se encuentra cierto porcentaje de ácido láctico, al que pueden acompañar vestigios de algunos metabolitos con estructuras de azúcares, como glucosa, glucosa-6-fosfato y otros azúcares-fosfatos.

Las carnes se consideran una fuente importante de componentes minerales, entre los que destacan el fósforo, el yodo, el manganeso, el cinc o el selenio, aunque sus cantidades pueden variar con el tipo de alimentación recibida. Además, proporciona hierro en forma orgánica hemo, que es fácilmente asimilable. También, los productos cárnicos destacan por su contenido en

vitaminas del complejo B, en especial tiamina (B₁), riboflavina (B₂), niacina (B₃), piridoxina (B₆) y cianocobalamina (B₁₂).

El contenido de agua que presentan las carnes varía entre un 60 y un 80 %. El agua del tejido muscular puede encontrarse en diferentes formas y con distinta movilidad, y se localiza en diversas zonas: (i) en las proteínas musculares; (ii) en los espacios localizados entre los filamentos gruesos de miosina y delgados de actina; (iii) en los espacios interfibrilares dentro del sarcoplasma y (iv) en el espacio extracelular. Muchas de las propiedades de la carne fresca como textura, firmeza, blandura, jugosidad u olor dependen en gran parte de las diversas formas en las que se encuentran las moléculas de agua en el músculo y de las proporciones en las que puedan ser retenidas.

La capacidad que posee el músculo para retener de manera firme el agua de su constitución se denomina capacidad de retención de agua. Esta propiedad del músculo se ve afectada por factores intrínsecos del animal, como son la especie o la edad, y por factores propios del proceso de conversión del músculo en carne, principalmente el pH del músculo. Valores elevados de este pH favorecen la capacidad de las proteínas para ligar moléculas de agua ya que se encuentran alejadas de su punto isoeléctrico (punto en el que existe una ausencia de cargas en las estructuras proteicas que impide la retención de las moléculas de agua). Sin embargo, tras el sacrificio, el pH del músculo se reduce por la producción de ácido láctico durante la glucólisis anaerobia, haciendo que las proteínas se encuentren más cerca de su punto isoeléctrico y su capacidad de retención de agua se reduzca. Otro de los factores que modifican la capacidad de retención de agua es la implantación del *rigor mortis* tras el sacrificio ya que produce la contracción muscular y el enlace irreversible entre las proteínas actina y miosina.

Por todo ello, la capacidad de retención de agua tiene importancia desde varios puntos de vista. En primer lugar, influye, como ya se ha dicho anteriormente, en la calidad sensorial ya que incide en la textura, jugosidad, color y dureza de la carne. Además, tiene una gran importancia desde el punto de vista nutricional porque la pérdida de agua arrastra otras sustancias como pueden ser minerales y vitaminas hidrosolubles. Por último, el agua es responsable de las denominadas pérdidas por goteo que suelen ocurrir en los cortes de carne

expuestos para su venta y que se traducen en pérdidas de peso, cambios en la palatabilidad e incluso modificaciones en el valor nutritivo. Debido a esta importancia, en muchos productos elaborados a base de carne se añaden sales, principalmente cloruro sódico y fosfatos, para elevar la capacidad de retención de agua y mejorar la calidad de los productos.

1.2.4. Factores que influyen en la composición.

Los factores intrínsecos que influyen en la composición de la carne de una determinada especie son diversos, entre los que cabe citar la raza, la edad y el sexo. De unas razas a otras pueden existir diferencias en el porcentaje en proteínas, diámetro de las fibras musculares y comportamiento frente a la fuerza de la cizalla de la carne, pero las variaciones más amplias se observan en el contenido en grasa, que siempre es mayor en los animales que han sido sometidos a una menor selección genética. La edad afecta a la composición de la canal, especialmente a la relación músculo/hueso/grasa y a la riqueza de la grasa intramuscular. La intensidad del color de la porción magra aumenta con la edad debido a que influye de forma directamente proporcional en el contenido en mioglobina. La edad influye también en la composición de la carne tanto en lo referente a la grasa, ya que se acumula más grasa a medida que envejece; como en las proteínas que, al avanzar la edad, contienen menos colágeno aunque con más entrecruzamientos. El sexo afecta al contenido en grasa intramuscular: los machos poseen menos que las hembras. Además, la castración afecta tanto a la riqueza de la grasa, que es mayor en los animales castrados, como a su composición, que se refleja fundamentalmente en los ácidos grasos, siendo más insaturados en los animales enteros.

Los factores extrínsecos que afectan a la composición de la carne son igualmente diversos, pero sin lugar a dudas el de mayor importancia es la alimentación. Por ejemplo, si se aumenta el contenido en carbohidratos o grasa en la dieta se favorece el engrasamiento de las canales, mientras que no tiene efecto en la composición proteica. Aunque este factor también se ve influenciado por el tipo de especie ya que los animales monogástricos tienden a depositar la grasa de la dieta sin apenas modificaciones. Sin embargo, en los rumiantes la composición de la grasa es más constante, dado que los microorganismos del rumen pueden hidrogenar los dobles enlaces de los ácidos

grasos, lo que se manifiesta en un menor efecto de la dieta en la composición de los ácidos grasos. En la Tabla 3 se muestra la proporción en la que se encuentran los principales ácidos grasos en la carne de cuatro de las especies animales más ampliamente consumidas.

Tabla 3. Composición en ácidos grasos de los triglicéridos integrantes de las grasas de algunas especies animales más ampliamente consumidas (porcentaje de la cantidad total).

Ácido graso	Cerdo (%)	Ternera (%)	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
Esteárico (C18:0)	12,5	10,0	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

Fuente: Hernandez Gil, A. *Tratado de nutrición. Composición y Calidad Nutritiva De Los Alimento. Volumen 2. Editorial Panamericana. Madrid, España. 2010.*

Como se puede observar el ácido graso que se encuentra en mayor proporción en los cuatro tipos de carne es el oleico (C18:1), seguido del palmítico (C16:0), esteárico (C18:0) y linoleico (C18:2). Estudios realizados en carne de toro de lidia y potro han encontrado resultados similares. Así, Beriain, M.J. *et al.* (2011) señalaron en su estudio sobre la calidad de la carne de toro de lidia en España que el ácido graso mayoritario es el oleico (C18:1), variando entre 39,4 % y 26,2 %, seguido del ácido palmítico (C16:0) (21 %) y el ácido esteárico (C18:0) (variando entre 19,5 % y 11,5 %). Sin embargo, Sarriés, M.V. *et al.* (2006) señalaron en su estudio sobre la carne de potro que el ácido graso mayoritario era el palmítico (C16:0), variando entre 29,81 % y 28,63 %, seguido del oleico (C18:1) y linoleico (C18:2). Esta variación en el perfil lipídico de la grasa estaría relacionada con los aromas específicos de cada especie animal contribuyendo al perfil aromático característico de cada tipo de carne.

Además, se considera que la composición química de la carne es un factor determinante en las cualidades de sabor y aroma de la misma. Tanto el sabor de la carne como su aroma son atributos que dependen de las contribuciones

aportadas por la presencia de los compuestos químicos formados como consecuencia de los procesos bioquímicos implicados en la conversión del músculo en carne: azúcares reductores hidrosolubles, aminoácidos libres, naturaleza de los ácidos grasos libres, compuestos aromáticos hidrosolubles y oxidación de los dobles enlaces en los compuestos insaturados. Cada uno de ellos influye en el sabor de la carne, proporcionándole unas características específicas, estrechamente relacionadas con los niveles de dichos metabolitos y sus concentraciones relativas. Por otro lado, durante el tratamiento térmico de la carne los compuestos químicos que forman parte de ella sufren una serie de modificaciones para dar lugar a compuestos volátiles que contribuyen al aroma. Se sabe que las proteínas fibrilares y sarcoplasmáticas de alto peso molecular tiene poco efecto en el desarrollo del sabor de la carne. Además, como la composición en carbohidratos y aminoácidos libres de la carne de las diferentes especies son similares, el aroma producido durante el tratamiento térmico va a ser similar. Sin embargo, los componentes lipídicos de la carne, principalmente los lípidos intramusculares, modifican el aroma durante el tratamiento térmicos del músculo, produciendo tanto aromas deseables como indeseables.

2. Métodos de medida de la composición química.

Como ya se ha comentado en el apartado anterior, 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. Por ello, en los apartados siguientes se va a describir de forma breve los métodos más usados para determinar la composición proteica y lipídica de una muestra.

Como aspecto común a todos, las muestras analizadas deben ser representativas y encontrarse debidamente homogeneizadas. Para ello, tras la separación de la muestra de los restos de piel, grasa intramuscular y tejido conectivo, se pica en una trituradora eléctrica hasta conseguir el producto deseado.

2.1. Composición proteica.

Los métodos de determinación de proteínas totales están basados en las características diferenciales de las mismas respecto del resto de biomoléculas presentes en las muestras biológicas. Hay métodos que tienen su principio en la determinación de la cantidad de nitrógeno presente (método de Kjeldahl), en la presencia del enlace peptídico (método de Biuret, método de Lowry y método de BCA o ácido bicinónico), en la formación de complejos con determinados agentes (método de Bradford) o en la capacidad de las proteínas de precipitar en presencia de determinados agentes caotrópicos (nefelometría). En algunos casos es necesario que las proteínas reaccionen con algún reactivo que les permita adquirir una característica que pueda medirse, como puede ser el color, ya que, aunque la presencia de los residuos de tirosina o triptófano puede permitir su medida por absorción, ésta es demasiado baja e inespecífica para poder ser utilizada por sí misma en la cuantificación de las proteínas.

Los primeros factores a considerar para seleccionar un método de análisis son la naturaleza de la muestra y la presencia de sustancias que puedan interferir. Por ello, a veces es necesaria una etapa previa de purificación para eliminar las sustancias que interfieren. Para conseguirlo, existen varias posibilidades. Por ejemplo, se pueden precipitar las proteínas solubles, lavarlas y cuantificarlas después por un método adecuado. Si la precipitación se realiza por calor o con ácidos fuertes, este proceso es irreversible, por lo que es necesario utilizar un método del tipo del método de Kjeldahl. Si la precipitación se produce con sales o alcohol, el precipitado proteico puede redisolverse en una base, con lo que después puede utilizarse un método para la determinación de proteínas totales como el del Biuret. Otra posibilidad es eliminar las sustancias que producen la interferencia, que a menudo son moléculas pequeñas (como aminoácidos), por diálisis.

2.1.1. Método de Kjeldahl (ISO-937; Métodos de Análisis de Productos Cárnicos (BOE 29/8/79)).

El método de Kjeldahl (1883) sirve para determinar la cantidad total de nitrógeno de un compuesto, aunque puede utilizarse para calcular la cantidad de proteína que hay en una muestra, multiplicando esa cantidad por el factor

6,25, asumiendo que todas las proteínas analizadas tienen un 16 % de nitrógeno, lo cual no es del todo cierto. La presencia de nitrógeno no proteico puede interferir en la determinación del contenido en proteínas por este método. Este problema puede evitarse precipitando las proteínas y determinando la presencia de nitrógeno en el precipitado de las mismas.

El método Kjeldahl se basa en una digestión ácida durante varias horas de la muestra en caliente con ácido sulfúrico y con la presencia de iones cúpricos. El ión amonio se evapora en forma de amoniaco en presencia de NaOH. Dicho vapor, es recogido por destilación contra corriente en un frasco receptor que contiene ácido bórico, transformándose de nuevo en NH_4^+ . Los iones NH_4^+ son valorados con ácido clorhídrico (HCl), utilizando como indicador el rojo de metilo. A partir del número de equivalentes de HCl utilizados, se puede conocer la cantidad de nitrógeno presente y, multiplicando por el factor adecuado, la cantidad de proteína.

El método de Kjeldahl es capaz de discernir entre muestras con una variación del orden del 1 %, pero se debe conocer el porcentaje de nitrógeno en las proteínas de las muestras analizadas ya que éste porcentaje determina el factor que hay que aplicar.

2.1.2. Método de Biuret (Ritthausen, H y Pott, R., 1873).

El nombre del método se lo proporciona el reactivo conocido como Biuret que está compuesto por la mezcla de sulfato de cobre y tartrato de sodio-potasio disuelto en una solución de hidróxido sódico. Este reactivo forma complejos de coloración azul al unirse con el Cu^+ . Se basa en que los enlaces peptídicos de las proteínas son estructuralmente similares a los de dicho compuesto, reaccionando de la misma forma.

Para poder utilizar este método, es necesaria la presencia de proteínas que presenten al menos dos enlaces peptídicos o dos grupos amida consecutivos, por lo que no sirve para el análisis ni de aminoácidos ni de dipéptidos. Esto se debe, a que estos grupos son capaces de reducir el Cu^{2+} a Cu^+ , permitiendo que el Cu^+ forme un complejo con las proteínas en medio alcalino, que produce una coloración azul. Esta coloración presenta su máxima intensidad a los 10 minutos

del inicio de la reacción y es estable durante varias horas con máximos de absorción de radiación electromagnética a 330 y 545 nm. Aunque en este método las medidas de absorción a la menor longitud de onda de absorción (330 nm) proporcionan mayor sensibilidad (ya que el coeficiente de extinción molar es mayor), también es más fácil que ha dicha longitud de onda se presenten interferencias debidas a la presencia de otros compuestos.

Este método nos permite conocer el contenido proteico de una muestra ya que la cantidad de luz absorbida por el complejo es directamente proporcional al color producido, ya que cumple la ley de Lambert-Beer, siendo necesario la determinación previa de una recta de calibración. A la vez, esa absorbancia está relacionada, mediante la recta de calibración, con el número de enlaces peptídicos y con el contenido total de proteína de la muestra.

También hay que tener en cuenta que el color desarrollado por los distintos tipos de proteínas no es exactamente igual, aunque las desviaciones son menores que con otros métodos colorimétricos. Sin embargo, los resultados pueden verse afectados por la presencia de lípidos y otros compuestos de origen biológico.

2.1.3. Método de Lowry (Lowry, O.H. et al., 1951).

En este método se utilizan tres sistemas para producir coloración como consecuencia de la presencia de proteínas. En primer lugar, el Cu^+ , en presencia de dos enlaces peptídicos consecutivos forma un complejo que da lugar a un compuesto coloreado azul, de manera similar al método de Biuret. En segundo lugar, este compuesto es capaz de reducir al reactivo de Folin-Ciocalteu, formado por ácido fosfotúngstico y fosfomolibdico, dando un color aún más azulado. Por último, este reactivo, en presencia de residuos de tirosina, reacciona produciendo así mismo un color azul por la reducción del fosfomolibdato en medio básico.

Debido a esta sucesión de reacciones, el espectro de absorción no se corresponde con una única sustancia, por lo que puede emplearse un amplio margen de longitudes de onda, entre 500 y 700 nm, para la lectura de la absorbancia.

Este método es unas 100 veces más sensible que el del Biuret y además, es muy específico porque existen pocas sustancias que se encuentren en los materiales de origen biológico que presenten interferencias en el mismo. Sin embargo, hay que tener en cuenta, que este método tiene un origen empírico, ya que también es necesaria una recta de calibración, y la intensidad del color varía según la composición en aminoácidos de las proteínas y de las condiciones en las que se realiza el análisis, no siendo éste, directamente proporcional a la concentración de proteínas.

2.1.4. Método del BCA (ácido bicinconínico) (Smith, P.K. et al., 1985).

En este método se produce la combinación de dos reacciones para obtener un producto coloreado que se pueda medir y por lo tanto, conocer el contenido en proteína total de una muestra. Primero, se produce la reducción del Cu^{2+} a Cu^{+} por parte de las proteínas en medio alcalino, igual que sucede en el método de Biuret. En segundo lugar, se produce la determinación de los iones cuprosos formados por el establecimiento de un complejo con el ácido bicinconínico (BCA). El producto final, presenta una coloración púrpura, con un máximo de absorción a 562 nm. También es necesario, al igual que en los métodos anteriores, la construcción previa de una recta de calibración.

2.1.5. Método de Bradford (Bradford, M.M. 1976).

Este método se fundamenta en la unión de las proteínas al colorante azul brillante de Coomassie G-250. Esta unión, provoca un desplazamiento del máximo de absorción del colorante desde 465 nm a 595 nm, donde se realiza las medidas de absorbancia. También requiere la construcción de la recta de calibración previa.

2.1.6. Nefelometría y turbidimetría.

Algunos métodos para la cuantificación de proteínas se basan en la facilidad que presentan muchas de ellas para precipitar en determinadas condiciones. Para ello, se utilizan reactivos específicos de precipitación, generalmente ácidos orgánicos, como el ácido tricloroacético, y la turbidez producida se compara

fotométricamente con la producida por una concentración conocida de proteína.

Cuando la luz choca contra una partícula en suspensión, parte de esta luz es dispersada. La dispersión de la luz por una partícula depende de su tamaño, de su índice de refracción con relación al del líquido que la rodea y de la longitud de onda de la luz. La luz dispersada por las partículas en suspensión puede medirse por dos técnicas, que son turbidimetría y nefelometría. Por un lado, la turbidimetría se basa en la medida espectrofotométrica de la disminución de la luz transmitida a través de una solución. Sin embargo, la nefelometría se basa en la medida de la luz dispersada a diversos ángulos por una suspensión de partículas.

2.1.7. Método de combustión directa o método Dumas (Dumas, J.B.A., 1831).

En el método Dumás, la muestra se calienta en un horno, en presencia de óxido de cobre y un oxidante, hasta alcanzar una temperatura igual o superior a 850° C para que se produzca la completa liberación del nitrógeno de la misma. Este nitrógeno liberado debe ser separado del resto de productos de combustión, como puede ser el dióxido de carbono o el agua, para su posterior cuantificación. El volumen de nitrógeno producido es analizado, previa corrección a las condiciones estándares, y convertido a equivalentes de masa. Los resultados pueden ser expresados tanto en porcentaje de nitrógeno como de proteína, aplicando el factor de conversión correspondiente.

2.2. Composición lipídica.

En este tipo de análisis, no se determina el contenido real en grasa sino la fracción lipídica que los alimentos contienen. Esta fracción incluye no sólo grasas sino también sustancias tan variadas como los fosfolípidos, los esteroides, los terpenos o las vitaminas solubles en grasa. A pesar de ello, las grasas constituyen aproximadamente el 99 % de la fracción lipídica de los alimentos por lo que en el análisis ambos términos se hacen indistinguibles.

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

2.2.1. Procedimientos de extracción.

Estos procedimientos implican la extracción de la grasa de los alimentos con la mínima exposición de la muestra al calor y a la luz. Para ello, se usa un disolvente apropiado que después, debe ser eliminado para así poder valorar el residuo. Los disolventes más comunes son el hexano, el dietil éter y el éter de petróleo. La eficiencia de la extracción depende de varios factores entre los que se incluyen la polaridad del disolvente, la cantidad de grasa libre presente en el alimento, ya que ésta puede encontrarse unida a otros componentes como a las proteínas o los carbohidratos, y de los procedimientos que se usen para liberar esas grasas. A continuación, se describirán algunos de los métodos más representativos.

La extracción Soxhlet (1879) (ISO-1443; Método de Análisis de Productos Cárnicos (BOE 29/879)) que consiste en una extracción en continuo mediante un disolvente orgánico no polar. Para ello, una cantidad conocida de muestra previamente desecada se coloca en un cartucho poroso que se introduce en la cámara de extracción que se encuentra conectada por la parte inferior a un matraz seco y de peso conocido donde se colocará el disolvente. Por la parte superior, esta cámara está conectada a una zona de refrigeración. Cuando se calienta el matraz que contiene el disolvente, este se evapora, condensa en el serpentín de refrigeración y es recogido en la cámara de extracción. El proceso se repite continuamente, hasta que se asume que toda la grasa ha sido extraída y se encuentra en el matraz. La eliminación del solvente por evaporación, deja la grasa como residuo en el matraz, que será nuevamente pesado y el incremento de peso se atribuye a la grasa presente en la muestra. En el caso de algunos alimentos como la carne, parte de la grasa puede encontrarse unida a otras sustancias y es necesario romper esta unión con ácido clorhídrico como paso previo a la extracción.

En el método de Bligh y Dyer (1959) consiste en la homogeneización de las muestras húmedas con metanol y cloroformo en proporción 2:1 para que se

forme una fase sencilla miscible con el agua. Una vez conseguido esto, se añade cloroformo para así obtener la separación de fases, y los disolventes son separados mediante centrifugación, siendo la capa de cloroformo la que contiene la grasa disuelta. De esta forma, se obtiene el residuo de grasa que será pesado para su cuantificación. Este método fue desarrollado como modificación del método de Folch *et al.* (1957), en el que las proporciones de metanol y cloroformo utilizadas varían, usándose una mezcla en proporción 1:2 (metanol:cloroformo). Después de la extracción, los compuestos de origen no lipídico son eliminados ajustando la proporción entre cloroformo, metanol y agua a 8:4:3, respectivamente. El respecto del proceso 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 a la muestra con ácido clorhídrico caliente para romper las uniones de las grasas con las proteínas. Tras ello, se produce la extracción de la grasa con dietil éter o una mezcla de dietil éter y éter de petróleo. La eliminación de los disolventes, deja la grasa que es cuantificada por simple pesada. Este método, no es adecuado para alimentos ricos en azúcares 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 digerida mediante ácido clorhídrico caliente, como en el método anterior, pero el residuo obtenido es filtrado mediante un papel de filtro. Este papel, tras su secado, es colocado en un aparato de extracción tipo Soxhlet y se le aplica disolventes como el dietil éter o el éter de petróleo, siendo el resto del procedimiento igual que el método Soxhlet.

Por último, el método Mojonier (1925) y Rose-Gottlieb (ISO 1737:2008) son métodos similares en sus procedimientos pero utilizan diferentes equipos. Se diferencian del resto de métodos antes explicados en que 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.

2.2.2. Procedimientos volumétricos.

En estos métodos, la digestión de la muestra se realiza mediante ácido sulfúrico concentrado en un recipiente de cristal especialmente diseñado para este método y que se encuentra calibrado mediante una escala. La mezcla es centrifugada para separar la grasa de la fase acuosa y, después de dejar a la mezcla alcanzar una determinada temperatura, la cantidad de grasa presente se obtiene mediante la lectura de la escala que el recipiente tiene. Existen dos métodos ampliamente utilizados el método de Gerber y el método de Babcock.

El método de Gerber (Gerber, N., 1891) es utilizado principalmente en Europa y Reino Unido. Para este método, se han diseñado unos tubos específicos denominados de Gerber o butirometros. El procedimiento empieza con la medida de una cantidad específica de muestra que se coloca en el butirometro, a la que se le adiciona ácido sulfúrico concentrado, para la digestión, y alcohol amílico para facilitar la separación de la grasa y la fase acuosa. Además, también se puede añadir agua para elevar el nivel del líquido hasta que la grasa se encuentre dentro de la escala del butirometro. La adición del ácido sulfúrico produce la elevación de la temperatura de la mezcla haciendo que la grasa se licúe. A veces, en ocasiones, es necesario colocar el recipiente en un baño de agua caliente para favorecer la total licuefacción de la grasa. A continuación, la mezcla es centrifugada, mediante una centrifuga especialmente diseñada para este experimento, a 1100 rpm. Tras ello, los tubos se colocan en un baño de agua a 65° C para estandarizarlos antes de realizar la lectura. El método de Babcock (1890) es muy similar al anterior, diferenciándose exclusivamente en que el recipiente utilizado es distinto y posee diferente escala. Este método es más usado en Estados Unidos.

3. Espectroscopia de infrarrojo.

Cada onda electromagnética emitida o absorbida por alguna molécula se caracteriza por el valor de su longitud de onda (λ) o por el valor de su frecuencia (ν). Esas longitudes de onda o su equivalente en frecuencias componen el espectro electromagnético, que puede ser dividido en rayos

gamma, rayos X, luz ultravioleta, luz visible, luz infrarroja, microondas, onda corta y ondas de radio (Figura 13).

La región del infrarrojo del espectro abarca la radiación con números de ondas comprendidos entre 12.500 y 10 cm^{-1} , que corresponden a longitudes de onda de 0,8 a 1.000 μm . Tanto desde el punto de vista de las aplicaciones como de la instrumentación, es conveniente dividir el espectro de infrarrojo en tres regiones denominadas infrarrojo cercano (12.500-4.000 cm^{-1}), medio (4.000-400 cm^{-1}) y lejano (400-5 cm^{-1}).

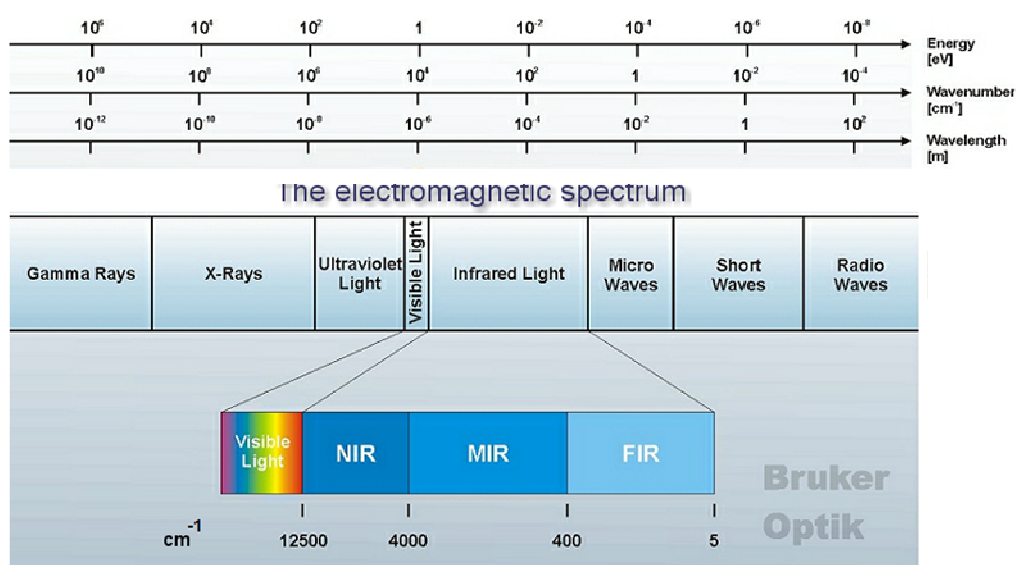


Figura 13. Espectro electromagnético (Fuente: Introduction to FT-IR Spectroscopy. Bruker)

Las técnicas y las aplicaciones de los métodos basados en cada una de las tres regiones del espectro infrarrojo difieren considerablemente. Las medidas en la región del infrarrojo cercano se realizan con fotómetros y espectrofotómetros similares, en cuanto a su diseño y componentes, a los instrumentos utilizados en la espectroscopia ultravioleta y visible. Las aplicaciones más importantes de esta región espectral se encuentran en el análisis cuantitativo de materiales industriales y agrícolas y en los procesos de control.

Por otro lado, hasta principios de los años 80, los instrumentos para la región del infrarrojo medio o fundamental 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, de tal manera que, ahora la mayoría de los instrumentos nuevos se basan en la transformada de Fourier. La aparición de este tipo de espectrómetros relativamente baratos ha aumentado notablemente el número y tipo de aplicaciones de la radiación del infrarrojo fundamental. La razón de este incremento radica en el aumento de la relación señal/ruido y de los límites de detección. Antes de la aparición de estos instrumentos, la región espectral del infrarrojo medio se utilizaba en su mayor parte para el análisis orgánico cualitativo y la determinación estructural, teniendo como base los espectros de absorción. Ahora, como contraste, la espectroscopia en el infrarrojo medio se está comenzando a utilizar además en el análisis cuantitativo de muestras complejas, mediante espectrometría de absorción y emisión.

El uso de la región del espectro del infrarrojo lejano, aunque potencialmente bastante útil, ha estado limitado en el pasado como consecuencia de diversas dificultades experimentales. Las pocas fuentes de este tipo de radiación que se encuentran disponibles son bastante débiles y además, se ven atenuadas por la necesidad de utilizar filtros de selección de órdenes espectrales para evitar que la radiación de mayores órdenes, que emerge de la red de dispersión, alcance el detector. Los espectrómetros basados en la transformada de Fourier, con un rendimiento muy superior, alivian en gran parte este problema y hacen a la región espectral del infrarrojo lejano mucho más accesible.

3.1. Fundamentos.

Los espectros de las diferentes especies moleculares en el infrarrojo son el resultado de los cambios energéticos producidos en las transiciones de las moléculas de unos estados de energía vibracionales y rotacionales a otros, entre los cuales existen pequeñas diferencias de energía. Estas transiciones producen un cambio neto en el momento dipolar de la molécula afectada provocando que el campo eléctrico alterno de la radiación pueda interactuar con la molécula y provocar cambios en la amplitud de alguno de sus movimientos. Por ello, las especies homonucleares (ejemplos: O₂, N₂ o Cl₂) que no pueden sufrir un

cambio neto durante la vibración o la rotación, no son capaces de absorber en el infrarrojo.

Las frecuencias en que se llevan a cabo esas oscilaciones moleculares están determinadas en gran medida por la naturaleza de los enlaces individuales en conjunto dentro de una molécula y por los tipos de grupos funcionales que se asocien directamente con la oscilación.

Las dos categorías básicas de vibraciones que se pueden distinguir son las vibraciones de tensión y de flexión. Una vibración de tensión supone un cambio continuo en la distancia interatómica a lo largo del eje del enlace entre dos átomos, pudiendo producirse una extensión o contracción de la misma. Las vibraciones de flexión se caracterizan por un cambio en el ángulo entre dos enlaces, pudiendo ser de cuatro tipos: balanceo, tijereteo, aleteo y torsión (Figura 14).

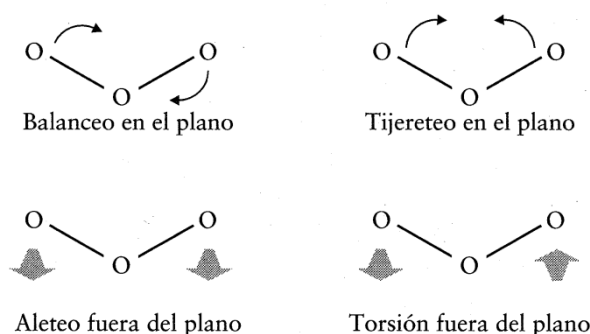


Figura 14. Oscilaciones moleculares distintas de flexión (Fuente: Higson, S.P.J., 2007).

En una molécula con más de dos átomos, son posibles todos los tipos de vibraciones, pudiendo además producirse una interacción o acoplamiento de las vibraciones si éstas involucran enlaces con un mismo átomo central. Como resultado de este acoplamiento, se produce un cambio en las características de las vibraciones implicadas. Con frecuencia, en la práctica, se observan menos picos que los que cabría esperar, y esto puede explicarse por los siguientes factores:

1. Cuando la simetría de la molécula es tal que no hay cambio de dipolo debido a una o más oscilaciones moleculares posibles.

2. Si una molécula puede tener dos o más vibraciones distintas que tengan energía casi idéntica, los picos de absorción de infrarrojo de esos procesos se pueden fundir, a veces, y parecer como uno solo.
3. Si una vibración molecular produce una absorción extremadamente pequeña, en algunos casos será demasiado débil para poder detectarla.

3.2. Instrumentación.

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

3.2.1. Espectrofotómetros dispersivos de red.

Los espectrofotómetros dispersivos de red contienen cinco componentes básicos: (i) una fuente estable de energía radiante; (ii) un selector de onda; (iii) un recipiente o lugar para la colocación de la muestra; (iv) un detector de radiación o transductor que convierte la energía radiante en una señal utilizable, por lo general eléctrica; y (v) un dispositivo para el procesamiento de la señal y de la lectura. La disposición de estos elementos básicos varía según el tipo de espectroscopia, siendo la utilizada para absorción en el infrarrojo la que aparece en la Figura 15.

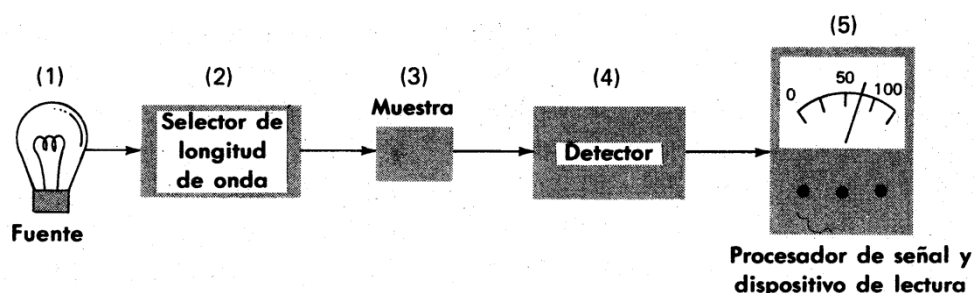


Figura 15. Disposición de los elementos en espectroscopia óptica de absorción
(Fuente: Willard, H.H. *et al.*, 1988)

Las fuentes de radiación utilizadas deben producir un haz de radiación cuya potencia sea suficiente para facilitar la detección y medida. Además, la señal producida por las mismas debe ser estable. Comúnmente, las fuentes de infrarrojo son sólidos inertes calentados eléctricamente hasta alcanzar

temperaturas entre 1.500 y 2.200 K. Como resultado de esto, se produce una radiación continua que se aproxima a la de un cuerpo negro. Los principales tipos de fuentes son el emisor de Nernst, la fuente Global y la fuente de filamentos incandescentes. El emisor de Nernst está constituido por óxidos de tierras raras que se encuentran en un cilindro de diámetro entre 1 a 2 mm y una longitud aproximada de 20 mm. En los extremos del cilindro se sellan unos cables de platino para permitir la conexión eléctrica, formando un conjunto que equivale a un elemento de calentamiento resistente. Cuando la corriente pasa por este dispositivo se alcanzan temperaturas comprendidas entre 1.200 y 2.200 K. Sin embargo, la fuente Global está formada por una barra de carburo de silicio, generalmente de 5 cm de longitud y 0,5 cm de diámetro, que también se calienta eléctricamente. La fuente de filamento incandescente está formada por una fuente de intensidad algo menor aunque de vida útil más prolongada en comparación con las anteriores. Consiste en una espiral muy apretada de alambre de nicromo, calentada por el paso de una corriente eléctrica.

Para la selección de la longitud de onda en la región infrarroja se han utilizado diferentes selectores como los filtros de interferencia o dieléctricos, los filtros de interferencia en forma de cuña o los monocromadores de prismas. En la actualidad, todos ellos han sido sustituidos por las rejillas de difracción que consisten en una serie de surcos paralelos y poco espaciados abiertos sobre un vidrio u otro material transparente. Este sistema suelen sustituir a los prismas dado que es posible obtener una resolución intrínsecamente mejor debido a que existe menos pérdida de energía radiante. Sin embargo, estos dispositivos producen una mayor cantidad de radiación dispersa y producen la aparición de radiación de otros órdenes espectrales.

Los espectrofotómetros dispersivos de red permiten analizar muestras sólidas, líquidas y gaseosas. Cada una de ellas, necesitan unos tratamientos previos y soportes especiales para que sea posible su análisis. Dado que en este trabajo final de carrera se va a trabajar con muestras sólidas, nos centraremos en este aspecto.

Los sólidos que no pueden disolverse en un disolvente transparente al infrarrojo pueden ser suspendidos en un medio transparente apropiado formando una mezcla de dos fases. Una condición esencial para la adquisición

de espectros satisfactorios es que el tamaño de partícula del sólido suspendido sea menor que la longitud de onda de la radiación; si no se cumple esta condición, se pierde por dispersión una parte importante de la misma.

Para el análisis de sólidos, comúnmente se emplean dos técnicas. En la primera de ellas, una pequeña cantidad de muestra finamente triturada (tamaño de partícula $< 2 \mu\text{m}$), se tritura aún más en presencia de una o dos gotas de un aceite pesado de hidrocarburo (por ejemplo, Nujol). En caso de que éste interfiera en las longitudes de onda a estudiar, puede ser sustituido por un polímero halogenado. En ambos casos, la mezcla resultante se examina colocando una delgada película entre dos placas planas formadas por una sal transparente al infrarrojo. En la segunda técnica, una cantidad aún menor de muestra finamente triturada, se mezcla íntimamente mediante un mortero o un pequeño molino de bolas con polvo de bromuro potásico (KBr) desecado. Una vez obtenida la mezcla, se comprime mediante una prensa o troquel especial para obtener un disco transparente. Si este proceso se realiza a vacío, los resultados obtenidos son mejores ya que se elimina el aire ocluido. Para realizar la medida, el disco se coloca mediante un soporte en el camino del haz.

En cuanto a los detectores de radiación, los primeros instrumentos para medir la absorción utilizaban métodos de detección visuales o fotográficos. En la actualidad, estos detectores se han sustituido casi por completo por transductores que convierten la energía radiante en una señal eléctrica. Para ser útil, el detector debe responder a la energía radiante de un amplio intervalo de longitudes de onda. Además, debe ser sensible a bajos niveles de potencia radiante, responder rápidamente a la radiación, producir una señal eléctrica que pueda amplificarse fácilmente y tener un nivel de ruido relativamente bajo para obtener una alta estabilidad. La señal producida debe ser directamente proporcional a la potencia del haz que incide en él. Los principales detectores utilizados son:

- a) Detectores térmicos. Con estos dispositivos se mide el incremento de temperatura que resulta cuando un pequeño cuerpo negro absorbe la radiación. Sin embargo, estos detectores presentan una serie de problemas ya que la medida se complica por el ruido térmico del medio circundante, siendo necesario el uso de vacío.

- b) Detectores piroeléctricos. Elementos constituidos por láminas cristalinas de un material piroeléctrico a los que cuando se les aplica un campo eléctrico tiene lugar una polarización eléctrica. Ésta, se mantiene dependiente de la temperatura aunque se elimine el campo eléctrico que la ha producido.
- c) Detectores fotoconductores. Elementos que constan de una delgada película de un material semiconductor (por ejemplo, telururo de cadmio o de mercurio, sulfuro de plomo o antimoniuro de indio) que es depositada sobre una superficie de un vidrio no conductor. Este vidrio, se encuentra sellado en una cámara a vacío para proteger al semiconductor de la atmósfera. En estos materiales, la absorción de radiación impulsa electrones de valencia no conductores a estados conductores de mayor energía, disminuyendo así la resistencia eléctrica del semiconductor.

Por último, por lo general, el procesador de señal es un dispositivo electrónico que amplifica la señal eléctrica generada en un detector. Además, puede modificar la señal transformándola, cambiando su fase o filtrándola.

3.2.2. Instrumentos basados en la transformada de Fourier.

Hasta los años 80, los instrumentos más utilizados fueron los espectrofotómetros dispersivos. En la actualidad, sin embargo, han sido desplazados por los espectrómetros basados en la transformada de Fourier, por su rapidez, fiabilidad y comodidad. Además, estos instrumentos presentan una relación señal/ruido que supera la de los instrumentos dispersivos de buena calidad en más de un orden de magnitud, presentando también, alta resolución, elevada exactitud y reproducibilidad en la determinación de las frecuencias.

La mayoría de los instrumentos de infrarrojo que usan la transformada de Fourier se basan en el interferómetro de Michelson. Estos equipos presentan, entre otros elementos, un espejo móvil, uno fijo y un divisor de haz (Figura 16). La radiación procedente de la fuente es colimada por un espejo y el haz resultante es dividido en dos por el divisor de haz. La primera de las mitades pasa al espejo fijo mientras que la segunda, es reflejada al espejo móvil.

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

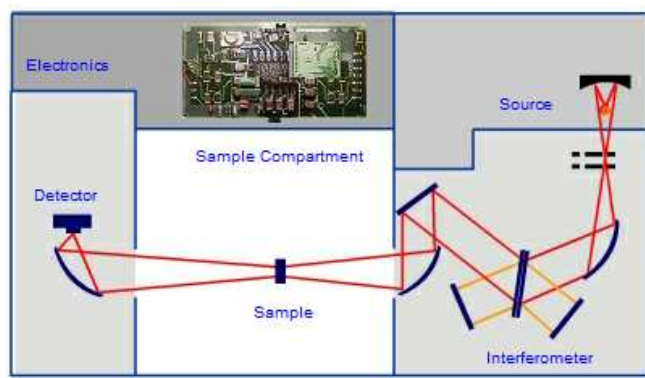


Figura 16. Esquema interior de un espectrofotómetro basado en la transformada de Fourier (Fuente: Introduction to FT-IR Spectroscopy. Bruker).

A la salida del interferómetro se obtiene una señal denominada interferograma. Esta señal es el resultado de las interferencias entre los haces reflejados en los espejos móvil y fijo para cada longitud de onda (frecuencia) de la luz proporcionada por la fuente. Cuando la diferencia de caminos entre ambos haces coincide en un número entero de longitud de onda, se produce una interferencia constructiva. Por el contrario, en el resto de casos, se producen interferencias destructivas. Así pues, el interferómetro es un modulador de señal y el interferograma es el portador de la información de las muestras. Mediante la Transformada de Fourier se transforma la información del interferograma al dominio frecuencial, obteniendo de esta forma los espectros usados durante este trabajo final de carrera. En la Figura 17 se puede observar un ejemplo de un interferograma de una fuente y su espectro correspondiente.

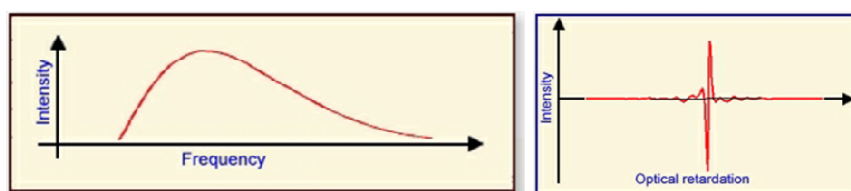


Figura 17. Interferograma de una fuente y su espectro correspondiente.

3.3. Comparativa entre métodos 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 en la energía del haz utilizado, 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.

4. Aplicaciones y perspectivas de futuro del empleo de espectroscopia MIR en la evaluación de la calidad de los alimentos.

Desde el inicio de la espectroscopia infrarroja, la zona del infrarrojo medio (MIR) ha atraído un gran interés debido a su capacidad para determinar la estructura de las moléculas (Sun, D-W., 2009). Los avances en la instrumentación combinados con el potente desarrollo del análisis de datos multivariante hacen que esta tecnología sea ideal para el análisis de grandes volúmenes de muestras mediante un proceso de escaneo rápido que permite la detección de componentes constituyentes de los alimentos hasta en pequeñas concentraciones, llegando a niveles de partes por billón (ppb).

La espectroscopia MIR es el método elegido para la caracterización estructural de las moléculas. Sus aplicaciones en el análisis de alimentos son diversas pero su uso es relativamente reciente y no tan usual como el del infrarrojo cercano (NIR). Su desarrollo se inició aproximadamente hace dos décadas, con el estudio por parte de numerosos investigadores de las posibles aplicaciones que ésta puede tener. Algunas de las áreas de investigación incluyen el estudio de las interacciones de los componentes de los alimentos, la cuantificación de nutrientes y otros componentes específicos de los alimentos, la caracterización estructural de las moléculas de los mismos, la determinación de la calidad de las materias primas y aditivos, así como la detección de adulteraciones y autenticación de alimentos.

El número de alimentos sobre los que se ha estudiado la aplicación de la espectroscopia MIR es muy variado, incluyendo miel (Sivakesava y Irudayaraj, 2002; Tewari y Irudayaraj, 2004), aceites y grasas alimentarios (Guillén y Cabo, 2002; Yang y Irudayaraj, 2001; Yang *et al.*, 2005), tomates (Scibisz *et al.*, 2011), patatas (Shiroma y Rodríguez-Saona, 2009; Liu *et al.*, 2012), albaricoques (Ruiz *et al.*, 2008), productos lácteos (Etzion *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2008), pescado (Hernández-Martínez *et al.*, 2013) o carne (Al-Jowder, O. *et al.*, 1999 y 2002; Meza-Márquez, O.G. *et al.*, 2010; Rohman, A. *et al.*, 2011).

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. 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 2011. Scibisz, I. *et al.* (2011) consiguieron medir mediante esta técnica la composición en sólidos solubles, la acidez total, el contenido de ácido cítrico y la concentración de los principales azúcares de una serie de variedades de tomates, para así poder determinar su calidad y su estado de madurez. Estos autores concluyeron que esta técnica era excelente para la estimación del contenido en sólidos solubles y la materia seca, siendo algo peor para la determinación de la acidez y el contenido en glucosa. Sin embargo, también explicaron que la espectroscopia MIR no servía para la predicción del contenido en ácido málico de los tomates, dado que este componente se encuentra en muy baja concentración. Y Shen, F. *et al.* (2011) utilizaron la técnica para determinar la calidad de un producto tradicional chino, el vino de arroz, mediante el análisis del contenido en azúcares y el grado de acidez del mismo. También intentaron mediante un análisis de componentes principales clasificar las muestras por su diferente proceso de producción y origen; aunque los resultados obtenidos no fueron muy satisfactorios. Por ello, estos autores concluyen que es necesario realizar más estudios para la incorporación de más muestras de diferentes variedades y orígenes.

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 *et al.* (2001) y, más recientemente, Burgula *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 autentificar los resultados, llevaron a cabo análisis clásicos mediante siembras. De esta forma, determinaron que los picos observados entre 1500 y 700 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 10^7 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.*, 2004), 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 diferencias, lo que aseguraría la reproductibilidad 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 vis-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.

En la Tabla 4 se recopilan las aplicaciones de la espectroscopia MIR al análisis de productos cárnicos.

Tabla 4. Aplicación de espectroscopia MIR en productos cárnicos.

Parámetro	Tratamiento previo de la muestra	Forma de medida	Rango de números de onda (cm ⁻¹)	Referencia bibliográfica
Diferenciación entre carne picada de cerdo, pollo y pavo. Y entre carne fresca y descongelada.	Picado de las muestras	Reflectancia	4000-800	(4)
Diferenciación entre músculo y tejido visceral.	Ninguno	Reflectancia	4000-800	(3)
Determinación del contenido de cordero en carne picada de ternera y cordero.	Picado de las muestras	Reflectancia	4000-640	(72)
Diferencias entre carne picada cruda de cerdo, pollo, pavo, ternera y cordero.	Picado de las muestras	Reflectancia	4000-640	(26)
Crecimiento bacteriano en carne de pollo.	Ninguno	Reflectancia	4000-600	(31)
Diferencias entre carne cruda de ternera y ternera con un contenido del 20 % de adulterantes (tejido visceral).	Ninguno	Reflectancia	4000-800	(5)
Crecimiento bacteriano en carne de ternera.	Ninguno	Reflectancia	4000-600	(30)
Composición en aminoácidos de las dietas animales.	Ninguno	Reflectancia	4000-650	(85)
Ternera almacenada al aire, en atmósfera modificada y en envases activos.	Ninguno	Reflectancia	4000-400	(6)

CAPÍTULO III. OBJETIVOS

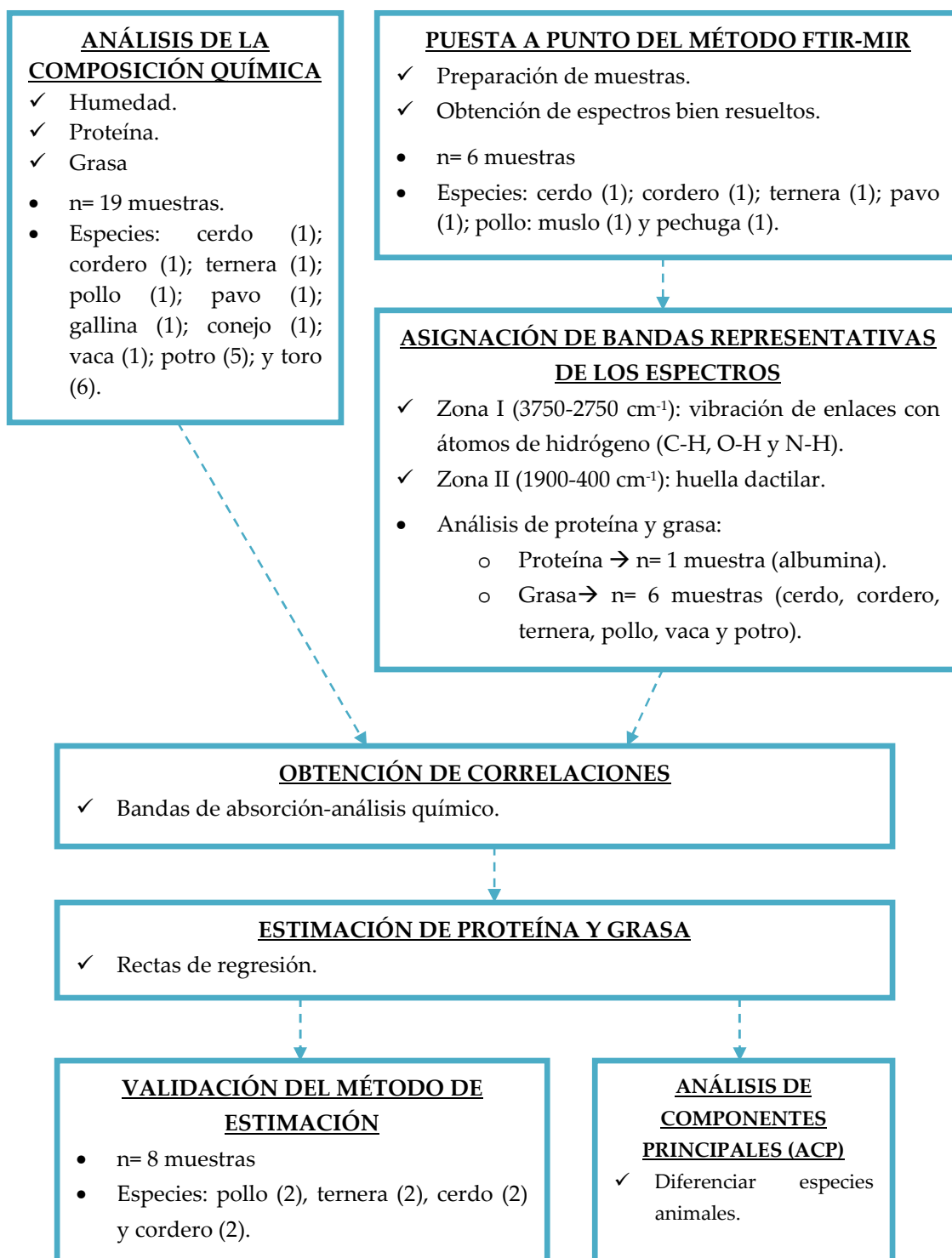
El objetivo principal que se pretenden alcanzar con el presente trabajo final de carrera es establecer un método de análisis de muestras de carne mediante espectroscopia MIR que permita obtener unos espectros de absorción bien resueltos, sin saturar el detector y con mínimo ruido en la línea base.

Además, se pretende alcanzar los siguientes objetivos parciales:

1. Identificar las bandas o números de onda más representativas en los espectros infrarrojos de muestras de carne.
2. Una vez asignadas las bandas características, el segundo objetivo parcial es correlacionar la absorbancia con el contenido proteico y lipídico de las muestras, para así establecer un método que permita poder conocer de forma rápida, sencilla y sin destrucción de la muestra la composición química.
3. Aplicar el Análisis de Componentes Principales (PCA) como método para poder clasificar las distintas especies animales.

CAPÍTULO IV. MATERIAL Y MÉTODOS

1. Diseño experimental.



2. Material animal.

Para la realización de este estudio, se utilizaron muestras de las principales especies animales con interés cárnico. El número total de muestras o animales diferentes utilizadas por cada tipo de especie se muestra en la tabla 5.

Tabla 5. Número total de muestras utilizadas de cada tipo animal.

Especie	Animal	Nº de muestras
Aviar	Pollo	4
	Pavo	2
	Gallina	1
Caballar	Potro	5
Cunícola	Conejo	1
Ovino	Cordero	4
Porcino	Cerdo	4
Vacuno	Ternera	4
	Vaca	1
	Toro	6

Todas las muestras pertenecen a animales cuyos sistemas de producción están controlados, perteneciendo algunas de ellas a marcas de calidad reconocidas. Las características de las muestras se recogen a continuación.

✓ Aviar:

- *Origen de las muestras:* suministradas por el grupo Alimentación Natural (AN).
- *Sistema de producción:*
 - Sistema integrado de producción.
 - Selección de estirpes en origen para buscar una genética homogénea, estable y con mejores propiedades.
 - Las granjas de cebo están tecnológicamente orientadas a la calidad y bienestar animal, utilizando las mejores tecnologías disponibles.
 - Control del ciclo total, con identificación de los animales desde el origen.



a) Pollo:

- *Características del animal:*
 - Pollo broiler o industrial.

- Peso de sacrificio: 2-2,5 kg.
- Producción en suelo, en naves de ambiente controlado.
- Alimentación: con piensos concentrados para conseguir un alto índice de conversión.

- *Referencia:* <http://www.grupoan.com/esp/inicio.html>

b) Pavo:

- *Características del animal:*
 - Sistema de producción intensivo.
 - Edad de sacrificio: 12-16 semanas.
 - Peso de sacrificio: 5-7 kg.
 - Alimentación: a base de granos de cereal (maíz blanco o amarillo, sorgo, arroz, trigo, cebada o sus subproductos), gluten de maíz y alfalfa molida.
- *Referencia:* Alañón Moya, F.J. *et al.* (2012).

c) Gallina:

- *Características del animal:*
 - Procedente del proceso de desvieje de granjas de gallinas ponedoras.
 - Animales con poco desarrollo muscular por su falta de ejercicio y porque la alimentación recibida está destinada a la máxima producción de huevos.
 - Edad de sacrificio: tras concluir el ciclo de puesta que dura aproximadamente hasta las 72 semanas de edad.
- *Referencia:* Buxadé, C. (1996).

✓ Caballar.

a) Potro:


- *Origen de las muestras:* pertenecientes a la raza Burguete.
- *Características del animal:*
 - Raza equina autóctona de Navarra.
 - Originada a partir del cruce de razas foráneas con animales de la raza Jaca Navarra.



- En la actualidad, debido a los pocos ejemplares existentes, está declarada en peligro de extinción (Orden Foral 36/2007, de 12 de febrero).
- Inicialmente se utilizaban como animal de trabajo y carga pero en la actualidad, su aptitud está dirigida a la vocación cárnica (Villanueva, M. *et al.*, 2009).
- *Sistema de producción:*
 - Sistema semi-extensivo.
 - Alimentación con pastos de montaña y prados durante la primavera, el verano y el otoño.
 - En invierno, los animales próximos a los núcleos poblacionales reciben una suplementación a base de concentrado o paja, según la oferta de alimentos naturales existentes según la época del año (Gómez, M.D. *et al.*, 2010).

✓ **Cunícula:**

a) **Conejo:**

- *Origen de las muestras:* suministradas por Avícola del Norte S.A. (AVINORSA; Álava), empresa perteneciente al grupo Aragonesa de Piensos S.A. (ARPISA). 
- *Características del animal:*
 - Peso vivo al sacrificio: 2-2,2 kg.
 - Duración del cebo: 25-32 días.
 - Alimentación: *ad libitum*.
- *Sistema de producción:*
 - Sistema de calidad integrado por un sistema de trazabilidad, un sistema de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (APPCC) y las normas ISO que aseguran la calidad.
- *Referencia:*
 - <http://www.arpisa.com>
 - González, P. y Caravaca, F. (2013)

✓ **Ovino.**

a) **Cordero:**


- *Origen de las muestras:* Indicación Geográfica Protegida (I.G.P.) Cordero de Navarra.
- *Características del animal:*



- Corderos machos y hembras de la raza Navarra y Lacha en pureza, procedentes de ovejas de la raza Navarra y Lacha, criadas en régimen extensivo o semiextensivo, alimentadas a base de pastos, forrajes y cereales, siguiendo la práctica tradicional de la zona.
- Criados y producidos en la zona de producción de la I.G.P.
- Alimentación: únicamente leche materna desde el nacimiento hasta el sacrificio.
- Características de las muestras:
 - Corderos lechales.
 - Peso canal (incluyendo cabeza y asaduras):
 - Entre 5 y 8 kg para los pertenecientes a la raza Lacha.
 - Entre 6 y 8 kg para los pertenecientes a la raza Navarra.
 - Cobertura de grasa: escasa o media. Clase 2 ó 3 (Reglamento (CEE) nº 2137/92).
 - Color de la carne: rosa pálido o rosa (Reglamento (CEE) nº 461/93).
 - Carne tierna, de gran jugosidad, de textura suave y sabor característico.
 - Sacrificio en mataderos inscritos a la I.G.P.
 - Tiempo mínimo de maduración: 24 horas.
- Referencia: Orden APA/1413/2002, de 23 de mayo.

✓ **Porcino.**

a) **Cerdo:**

- Marca: “Cercana” perteneciente a la  Federación Navarra del Porcino (FENAPOR).
 - Características de la marca:
 - Calidad garantizada mediante la implantación de un sistema de trazabilidad.
 - Las explotaciones inscritas garantizan el respeto al medio ambiente y evitar el estrés a los animales.
- Características de los animales:
 - Nacimiento, cebo, sacrificio y despiece en Navarra.

- Alimentación: mínimo 60 % de cereales, sin harinas cárnicas, sueros ni otras sustancias que alteren la calidad y sabor de la carne.

- Referencia: <http://www.fenapor-cercana.com>

✓ **Vacuno.**

a) **Ternera:**

- Origen de las muestras: Indicación Geográfica Protegida (IGP) Ternera de Navarra.
- Características de los animales:
 - Terneros machos o hembras de las razas Pirenaica, Blonde de Aquitania, Pardo Alpina, Charolais o los cruces entre sí.
 - Todos los animales deben ser criados en Navarra.
 - Alimentación: amamantamiento al menos durante los cuatro primeros meses de vida y después pasto siguiendo las normas tradicionales de aprovechamiento.
 - Edad de sacrificio:
 - Machos: entre 9 y 13 meses edad.
 - Hembras: entre 8 y 12 meses de edad.
- Características de las canales:
 - Refrigeración inmediata tras el sacrificio hasta temperatura igual o inferior a 7º C.
 - Período mínimo de maduración mínimo de 7 días desde el sacrificio.
 - Canales con conformación SEUR y estado de engrasamiento entre 2 y 3 (Reglamento (CE) nº 1183/2006 del Consejo, de 24 de julio de 2006).
 - Otras características:
 - Color carne: rojo.
 - pH a las 24 horas del sacrificio: igual o inferior a 6.
 - No poseer hormonas, clenbuterol, tranquilizantes, inhibidores, metales pesados, tiroestáticos o cualquier otra sustancia que suponga un riesgo para el consumo humano.
- Referencia: Orden Foral de 19 de junio de 2000.



b) Vaca:

- *Origen de las muestras:* procedente de un proceso de desvieje de una explotación de Francia.
- *Características de los animales:*
 - Procedentes de una explotación lechera.
 - Se sacrifican tras acabar su período productivo o tras detectar algún problema que no impida el consumo de su carne.
 - Peso medio canal: 250-300 kg.
- *Sistema de producción:*
 - No sigue un esquema fijo.
 - Período de acabado: 60-90 días.
 - Alimentación: a base de forrajes de calidad y concentrados (entre 1 y 3 kg diarios) para conseguir ganancias diarias de 1 kg.
- *Referencias:*
 - Phillips, C.J.C. (2010).
 - Flores, M.P. y Rodríguez, M. (2013).

c) Toro de lidia:

- *Origen de las muestras:*
 - Muestras procedentes de las fiestas de San Fermín 2011.
 - Ganadería: El Pilar (Salamanca)
- *Características del animal:*
 - Características zootécnicas y fisiológicas semejantes a las del vacuno de carne, aunque las normas tradicionales de cría y explotación difieren en los aspectos encaminados a formar unos animales cuyo mayor valor es la producción de comportamiento. (Caballero, J.R., 2002).
 - Todos los animales presentes en nuestros días derivan de unos pocos orígenes que se pueden denominar castas fundamentales: Jijona, Cabrera, Gallardo, Vazqueña, Navarra y Vistahermosa, siendo esta última de la que proceden la mayoría (Santa-Martina, J., 2001).
 - La raza de lidia es una raza de crecimiento lento, provocando un alargamiento de su ciclo productivo que genera un mayor

 **Ganadería El Pilar**

desarrollo muscular, siendo necesario entre 4 y 4,5 años tras el destete para alcanzar el peso adecuado para la lidia (Caballero, J.R., 2002).

- *Sistema de producción*: ligado al medio teniendo una gran importancia en los biosistemas ibéricos de explotación extensiva, principalmente en la dehesa (Cánovas, F. *et al.*, 1998).

3. Análisis de las muestras.

3.1. *Conservación de las muestras.*

Excepto las de toro y potro, todas las muestras han sido suministradas por una carnicería de Pamplona perteneciente a la Asociación del Gremio de Carniceros y Charcuteros de Navarra y colaborador habitual de la Universidad Pública de Navarra. Las muestras se compraron pocos días antes de su análisis y llevadas directamente a los congeladores situados en la Universidad Pública de Navarra, donde se conservaron a -20° C hasta el momento en el que se analizaron.

En caso de la carne de potro, estas muestras fueron suministradas por Carnicerías Goñi (Pamplona) siguiendo un tratamiento similar al resto de carnes. En el caso de las muestras de toro, estas habían sido recogidas en el matadero tras la lidia (Julio de 2011) y llevadas al laboratorio de la Universidad donde se envasaron al vacío. Posteriormente, fueron congeladas a -20° C para su adecuada conservación.

3.2. *Composición química de la carne.*

3.2.1. Determinación de humedad.

El análisis de humedad de las muestras se realizó siguiendo la norma ISO R-1442 y los Métodos de Análisis de Productos Cárnicos (BOE 29/8/79). En primer lugar, las cápsulas de porcelana, que contenían una varilla de vidrio y una cantidad de arena igual a 3-4 veces el peso de la muestra se secaron en una estufa a $102 \pm 2^{\circ}$ C durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo, se sacaron las

cápsulas de la estufa y se introdujeron en el desecador, hasta que alcanzaron la temperatura ambiente. En ese momento, se pesó el conjunto (cápsula, arena, varilla) con una precisión de 0,1 mg (P_0). Tras ello, se colocaron en las cápsulas aproximadamente 5 g de muestra y se pesaron nuevamente teniendo en cuenta la misma precisión (P_1). A continuación, se añadieron a las cápsulas 5 ml de etanol al 95 % y se removió la mezcla con la varilla de vidrio. Después, se colocaron las cápsulas en un baño de agua a una temperatura entre 60-80° C, hasta la evaporación del etanol. Luego, se secaron las muestras durante 4 h en la estufa a $102 \pm 2^\circ$ C. Una vez secadas las muestras, se retiraron las cápsulas de la estufa y se colocaron en el desecador, hasta temperatura ambiente. Por último, se pesaron de nuevo el conjunto con una precisión de 0,1 mg, repitiendo la operación el número de veces fuese necesario hasta que se alcanzase peso constante (P_2).

El porcentaje de humedad se calcula con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ humedad} = \frac{(P_1 - P_2) \times 100}{(P_1 - P_0)}$$

Siendo:

- P_0 = peso, en gramos, de la cápsula, la varilla y la arena.
- P_1 = peso, en gramos, de la cápsula, la varilla, la arena y la muestra antes de secado.
- P_2 = peso, en gramos, de la cápsula, la varilla, la arena y la muestra después del secado.

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

3.2.2. Determinación del contenido en grasa.

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 29/8/79). Antes de iniciar todo el procedimiento, fue necesario secar los matraces durante unas horas en la estufa para eliminar todo el agua que pudiesen contener y así poder conocer su peso seco (P_0).

El primero paso del procedimiento, consistió en pesar 2,5 gramos de muestra (P_2), con una aproximación de 1 mg e introducirlos en uno de los matraces. Tras ello, se añadió 100 ml de ácido clorhídrico 3 M y unos trozos de piedra pómez. A continuación, se cubrió la boca del matraz con un vidrio de reloj y se lo sometió a ebullición suave en una placa calefactora durante 1 hora. Tras su enfriamiento, se filtró sobre un doble filtro evitando cualquier paso de materia grasa al filtrado. A continuación, se lavó el residuo con agua fría hasta la desaparición de la reacción ácida, verificando que en el filtrado no existiese materia grasa. Ese filtro, que contenía el residuo, se colocó sobre un vidrio de reloj y se desecó durante hora y media en una estufa a 95-98° C.

Tras ello, se realizó una extracción Soxhlet que consistió en introducir el papel de filtro con el residuo en un cartucho de extracción. Para realizar esta operación, era necesario colocar sobre el matraz de destilación el cuerpo del Soxhlet y añadir éter etílico hasta que éste sifonase, echando un poco más en previsión de que se pudiese evaporar. A continuación, se colocó el cartucho en el cuerpo del Soxhlet, se introdujo el matraz dentro del baño de agua caliente (aproximadamente a 80° C) y se montó el sistema de refrigeración (Figura 18). Una vez colocados los sistemas de extracción en línea se abrió el grifo de agua para que ésta circulase y refrigerase el conjunto. Después de seis horas de extracción se eliminó el disolvente del matraz con un rotovapor. 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, pudiendo repitiendo la pesada hasta que se hiciese constante (P_1).



Figura 18. Sistema para extracción de grasa.

El porcentaje de grasa se calcula con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ grasa} = \frac{P_1 - P_0}{P_2} \times 100$$

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.

3.2.3. Determinación del contenido en proteína.

La determinación del contenido en proteína de la muestra se llevó a cabo según la norma ISO-937 y los Métodos de Análisis de Productos Cárnicos (BOE 29/8/79). El procedimiento consistió en pesar entre 1 y 3 gramos de las muestras y colocarlos en un matraz Kjeldahl, junto con unos granos de piedra pómez, 15 gramos de sulfato potásico, 0,5 gramos de sulfato de cobre y una punta de espátula de selenio en polvo. Tras lo cual se agregó 25 ml de ácido sulfúrico, mezclando la muestra y los reactivos mediante rotación y colocando el matraz en una batería calefactora, poniendo un embudo adecuado en la boca. Al principio se calentó suavemente y cuando el conjunto adquirió una cierta decoloración, se aumentó la intensidad de calefacción, agitando de vez en cuando con suavidad por rotación. Una vez que el líquido quedó transparente o con una coloración azul verdosa, se prolongó la ebullición al menos hora y media. Transcurrido ese tiempo, se dejó enfriar hasta temperatura ambiente y se añadió con precaución 100 ml de agua destilada al matraz, disolviendo por rotación suave el sulfato potásico cristalizado.

Por otro lado, se añadió 25 ml de ácido bórico al 4 % y unas gotas de indicador a un matraz erlenmeyer de 250 ml y se introdujo la alargadera del aparato de destilación hasta el fondo del erlenmeyer. De forma similar, se ajustó el matraz con la muestra al aparato. Cuando ambos estuvieron correctamente colocados, se agregó 100 ml de agua destilada y 100 ml de disolución del hidróxido sódico al 40 % desde el depósito superior del equipo. Tras ello, se calentó el conjunto hasta alcanzar la ebullición. Una vez alcanzado este punto, se continuó con el

proceso hasta que se consiguió recoger 150 ml de destilado o hasta el momento en que la ebullición se produjo a golpes. Tras ello, se retiró el erlenmeyer, se lavó la alargadera y el interior del refrigerante, recogiendo sobre el destilado las aguas del lavado. A continuación, se procedió a valorarlo con ácido clorhídrico 0,1 M hasta que volvió a tener la coloración original, violeta. También se efectuó una prueba en blanco, utilizando 5 ml de agua destilada en vez de la muestra, realizando todo el procedimiento de forma idéntica.

El porcentaje de proteína se calcula con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de } N \text{ total} = \frac{0,14 \times f \times (V_1 - V_2)}{P}$$

$$\% \text{ de proteína total} = 6,25 \times \% \text{ de } N \text{ total}$$

Siendo:

- f= factor de ácido clorhídrico
- V₁= volumen en ml de ácido clorhídrico gastado en la valoración.
- V₂= volumen en ml de ácido clorhídrico gastado en el ensayo en blanco.
- P= 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 análisis por FTIR.

3.3.1. Picado de las muestras.

Para el tratamiento de las muestras, el día anterior a su análisis, se colocaron las mismas en un frigorífico a 4º C durante 24 horas para su descongelación. Una vez descongeladas, se eliminaron todos aquellos restos de piel y grasa que pudiesen interferir en los análisis de las muestras. Tras ello, se picaron las muestras con una picadora Solac Quick Mix (Mod N202 de 500 W) durante el tiempo suficiente para obtener una masa homogénea donde no se pudiese identificar ningún elemento (Figura 19 y 20). Esta muestra se envolvió en papel de aluminio para evitar su deterioro hasta el momento de preparar las pastillas para el análisis por espectroscopia infrarroja. En aquellos casos en los que se

realizó el análisis químico de las muestras, se reservó parte de la masa obtenida para dicho fin.



Figura 19. Picadora Sola Quick Mix (Mod N202, 500 W).



Figura 20. Estado de la muestra tras el picado.

3.3.2. Preparación de las pastillas para los análisis de espectroscopia infrarroja.

Para obtener los espectros de IR de las muestras de carne, se prepararon pastillas mezclando 2 mg de carne con 198 mg de bromuro potásico (KBr). De esta forma, la concentración de la muestra y el espectro de las pastillas fueron constantes. El KBr es transparente a la radiación IR por ello no interfiere en las medidas realizadas (Willard, H.H., *et al.*, 1988). El día anterior a la preparación de las pastillas, se secó el KBr en la estufa a 105° C durante al menos 8 horas.

Todas las pastillas analizadas debían tener una masa final de 200 mg para que su espesor fuese constante y no influyese en las medidas, aunque pudiese variar la concentración final de carne. Inicialmente, se empezó preparando pastillas con una concentración de 2 mg y 6 mg de carne, pero como ya se comentará en

los resultados, tras observar que las pastillas con una concentración de 6 mg de carne no aportaba ninguna información nueva, se decidió realizar solo pastillas con una concentración de 2 mg de carne por cada 200 mg de pastilla. Por ello, a continuación, se explica el procedimiento para realizar estas pastillas.

Por cada muestra, se realizó por duplicado el siguiente procedimiento. Inicialmente, se pesaron en una balanza de precisión 10 mg de la carne, previamente picada, y 190 mg de KBr. Tras ello, se mezclaron y homogeneizaron en un mortero de agata hasta conseguir que no se identificase a simple vista la carne (Figura 21 y 22). Una vez obtenida esta mezcla, se pesaron 40 mg de esta mezcla y 160 mg de KBr, realizando de nuevo el mismo proceso de homogeneización.

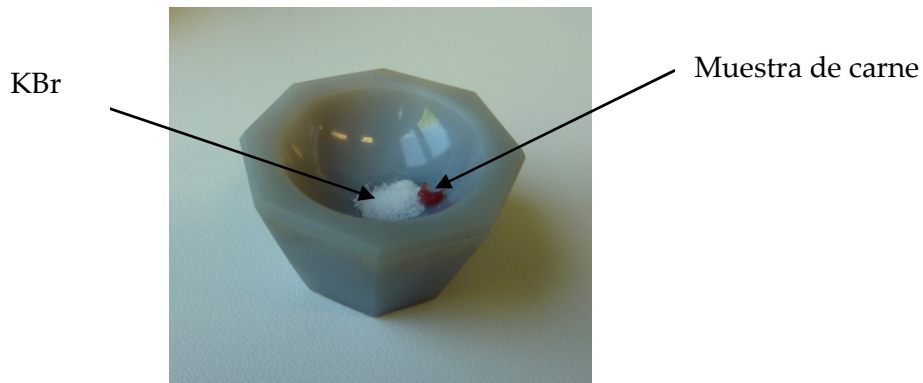


Figura 21. Estado de la muestra antes de su homogeneización con el mortero de agata.



Figura 22. Estado de la muestras tras su homogeneización.

Una vez obtenida la mezcla final, se colocó en un troquel (Figura 23) al que se le aplicó una presión de 10 tn mediante una prensa hidráulica manual (Specac,

Serie Atlas) (Figura 24). Durante el prensado, el aire que estuviese ocluido dentro troquel es eliminado mediante una conducción que posee el mismo. Tras ello, se procedió al desmoldado de la pastilla y a su conservación en una bolsa de polietileno, para evitar el contacto con el aire.



Figura 23. Troquel para prensa hidráulica.



Figura 24. Prensa hidráulica manual.

Una vez obtenidas las pastillas, se secaron en una estufa a 105° C para eliminar el agua, ya que ésta interfiere en las medidas realizadas en el infrarrojo medio pudiendo ocultar algunas bandas de absorción. Para ello, se colocaron las pastillas en unos recipientes de vidrio y se introdujeron en una estufa (Holelab) (Figura 25) a 105° C, dejándolas durante al menos 8 horas para asegurar un adecuado secado. Transcurrido este tiempo, se guardaron en un desecador (Figura 26) hasta su posterior análisis, transfiriéndolas de nuevo a las bolsas de polietileno justo antes de realizar las medidas.

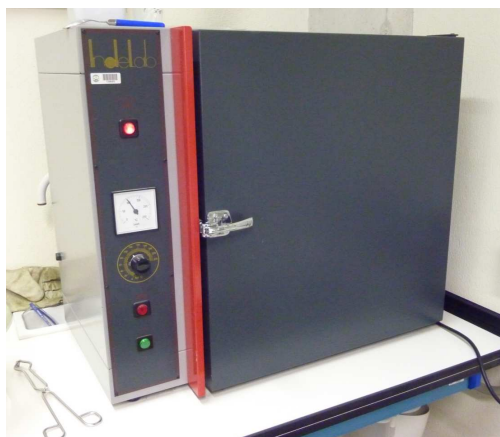


Figura 25. Estufa Holelab.



Figura 26. Desecador.

De igual forma, también se prepararon pastillas con muestras de grasa procedente de las diferentes especies animales cuya carne estaba siendo analizada y de una muestra de proteína compuesta por albumina de suero bovino con una pureza mínima del 96 %.

En el caso de las muestras con una concentración de 6 mg de carne por cada 200 mg de pastilla, el procedimiento fue similar, cambiando las cantidades que se debían pesar de cada elemento. En la primera mezcla, las cantidades debían ser las mismas (10 mg de carne y 190 mg de KBr). Obtenida la primera mezcla, se dispersaron y homogeneizaron 120 mg de esa mezcla con 80 mg de KBr.

3.4. Análisis mediante espectroscopia MIR.

En este trabajo se ha utilizado como instrumento de medida un espectrómetro FT-IR (*Fourier Transform – Infrared*). El modelo utilizado es el Vertex 80v de la casa comercial Bruker (Figura 27). Este modelo permite trabajar a vacío para eliminar cualquier interferencia que el vapor de agua o el dióxido de carbono pudiera producir en la medida.

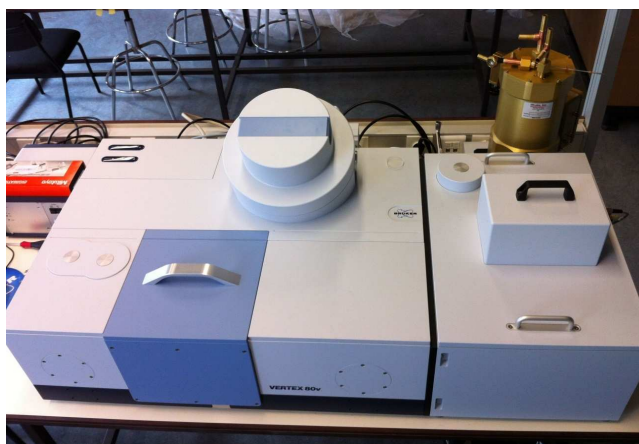


Figura 27. Equipo FT-IR Vertex 80v.

Durante la realización del trabajo se estableció un experimento base para asegurarse la repetibilidad del método de medida. Dado que en este trabajo final de carrera se ha trabajado en la región del infrarrojo medio (MIR), el rango de medida se definió entre los números de onda de 4000 a 400 cm^{-1} . Para este rango de medida se configuró el experimento con los siguientes elementos ópticos: una fuente Global, un beamsplitter de KBr y un detector DLaTGS.

Un parámetro importante a tener en cuenta en las especificaciones del experimento es la resolución espectral, es decir, la distancia existente entre puntos del espectro. Cuanta más pequeña sea esta distancia, más puntos espectrales y por lo tanto, mayor calidad del espectro se obtiene. Sin embargo, para asegurar un buen nivel de señal a ruido se necesita un mayor número de escaneos y por tanto aumenta el tiempo de medida. Para obtener un equilibrio entre una resolución adecuada al rango de medida y un tiempo de escaneo razonable la resolución elegida fue de 4 cm^{-1} y el número de escaneos se fijó en 32.

Por otro lado, en el proceso de medida siempre se toma un espectro de referencia en vacío, con el soporte portamuestras sin pastilla. A continuación, se mide la muestra y el propio software del equipo se encarga de hacer la división entre el espectro de la muestra y la referencia para la obtención final del espectro en transmitancia. Mediante software, se puede pasar el espectro a absorbancia y hacer una corrección de la línea base.

Para las medidas de las pastillas, se procedió a su colocación en un soporte (Figura 28) que posteriormente se introdujo en el cubículo de medida del equipo, colocándolo de esta forma en la zona de paso del haz de radiación.



Figura 28. Soporte para la colocación de las pastillas durante su medida.

4. Tratamiento estadístico de los datos.

El espectrofotómetro proporciona los espectros de absorción en el intervalo $4000-400\text{ cm}^{-1}$ que incluyen las bandas en el infrarrojo medio. En primer lugar, se determinó los picos característicos que se repetían en la mayoría de los espectros obtenidos, lo que indicaba que podían ser representativos de las muestras que se estaban analizando y que podrían aportar más información.

Una vez identificadas las bandas representativas, se obtuvieron los números de onda y las absorbancias correspondientes a dichas señales mediante el uso del programa informático Matlab R2012a. De esta forma, las muestras quedaron reducidas a un conjunto de puntos.

Conocidos las longitudes de onda interesantes, se identificaron los enlaces químicos que había causado la aparición de estos picos característicos.

Por otro lado, con ese conjunto de puntos se realizó una serie de matrices de correlación, mediante el uso de Excel 2010, para encontrar posibles relaciones entre las absorbancias de los distintos picos y para intentar correlacionar las absorbancias de las bandas y la composición química de la muestra.

Tras obtener esta información, se vio qué longitudes de ondas estaban relacionadas con el contenido graso de las muestras y mediante el uso de Excel 2010, se obtuvieron las rectas de regresión correspondientes. Estas rectas permiten predecir la composición lipídica de las muestras en función de los valores de absorción a una determinada longitud de onda.

Por último, mediante el uso de Matlab R2012a y SPSS (v. 20), se realizó con el conjunto de puntos seleccionados un análisis de componentes principales, para intentar agrupar las muestras y determinar si esas agrupaciones eran correctas, es decir, si las muestras pertenecientes a animales de la misma especie se encontraban cerca en esas agrupaciones.

CAPÍTULO V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El apartado de resultados y discusión se ha dividido en 5 partes. La primera de ellas, resume los resultados obtenidos en el análisis de la composición química de las muestras de carne. La segunda de las partes recoge el proceso de puesta a punto del método analítico para el análisis de muestras de carne mediante espectroscopia FTIR-MIR. En el tercer apartado se recopila el proceso seguido para la determinación de las bandas características de los espectros, su asignación a la vibración de los enlaces que producen la aparición de las mismas y su relación con el contenido lipídico y proteico de las muestras de carne. En la cuarta parte se recoge el método seguido para la estimación de la composición química de las muestras a partir de las intensidades de absorción. Por último, se muestran los resultados obtenidos al intentar clasificar las muestras por especies animales mediante un Análisis de Componentes Principales (ACP).

1. Composición química de las muestras.

Como paso fundamental para la realización de este trabajo final de carrera, se determinó el contenido de humedad, proteína y grasa de las muestras para así, poder comparar estos valores con los resultados obtenidos mediante los análisis realizados por espectroscopia infrarroja. Tal y como se explica en el capítulo de material y métodos, estos análisis se realizaron mediante el método gravimétrico (ISO R-1442), el método Soxhlet (ISO-1443) y el método Kjeldahl (ISO-937).

En las siguientes tablas se recopilan los resultados obtenidos para las distintas muestras de carne de diferentes especies animales. Para presentar los datos, se ha decidido agrupar las especies animales comercializadas habitualmente en un grupo, explicando en un apartado posterior los resultados obtenidos del análisis de las muestras de carne de potro y toro.

Tabla 6. Composición química de diversas especies.

Tipo de carne	Nombre de la muestra	Humedad (%)	Proteína (%)	Grasa (%)
Cerdo	C4	73,5	22,3	3,5
	C3	71,6	23,1	4,5
	C2	72,6	19,9	5,9
Conejo	CN1	70,5	21,3	7,2
Cordero	CO4	76,7	18,3	2,9
	CO3	74,3	18,0	5,9
	CO2	68,9	18,6	11,4
Gallina	GL1	71,6	25,7	1,1
Pavo	P2	75,1	20,2	2,9
Pollo	PP2	74,8	22,8	1,1
	PP4	74,7	23,4	1,2
	PP3	75,1	22,5	1,4
Ternera	T4	74,9	19,6	1,1
	T3	75,2	21,4	1,6
	T2	73,4	21,6	3,2
Vaca	V1	69,4	19,6	9,6

La Tabla 6 muestra los valores de humedad, proteína y grasa de las principales especies de interés cárnico. Los valores extremos del porcentaje de humedad corresponden a dos muestras de cordero, la denominada CO2 con 68,9 % y la muestra CO4 con 76,7 %. Por tanto se puede afirmar que, a menudo, la variabilidad es mayor entre muestras de una misma especie que entre diferentes especies. Los porcentajes de proteína variaron entre el 18,0 % para la muestra de cordero CO3 y 25,7 % para la muestra de gallina GL1. Por ello, se podría concluir que para una especie animal, el contenido en proteína tiene menor variabilidad. El contenido lipídico de las muestras varió entre 11,4 % para la muestra de cordero CO2 y 1,1 % perteneciente a las muestras de pollo PP2, gallina GL1 y ternera T4.

Como se puede observar, de algunas de las especies solo se conoce los datos de composición de una muestra por lo que no se puede estimar la variabilidad de las concentraciones dentro de esa especie. Aunque esto no supone ningún problema ya que uno de los objetivos de este trabajo final de carrera ha sido la estimación de la composición química de la carne, no la caracterización de las distintas especies. Sin embargo, dado que se posee información sobre varias

muestras de pollo, ternera, cerdo y cordero, se puede analizar su variabilidad. Las composiciones en humedad y proteína son bastante constantes, mientras que las concentraciones de lípidos varían dentro de una misma especie. Para poder estimar esta variabilidad, se ha calculado la desviación típica relativa (RSD) de dichos valores y se ha recogido en la Tabla 7.

Tabla 7. Media, desviación típica y desviación típica relativa de humedad, proteína y grasa de algunas especies animales.

Especie	Humedad			Proteína			Grasa		
	\bar{x}	σ_{n-1}	RSD (%)	\bar{x}	σ_{n-1}	RSD (%)	\bar{x}	σ_{n-1}	RSD (%)
Pollo	74,87	0,21	0,28	22,90	0,46	2,00	1,23	0,15	12,39
Ternera	74,50	0,96	1,29	20,87	1,10	5,28	1,97	1,10	55,78
Cerdo	72,57	0,95	1,31	21,77	1,67	7,65	4,62	1,23	26,62
Cordero	73,30	3,99	5,45	18,30	0,30	1,64	6,73	4,31	64,02

Las variaciones en la humedad de las muestras son pequeñas, ya que la desviación típica relativa toma valores bajos (0,28 % para pollo; 1,29 % para ternera; 1,31 % para cerdo y 5,45 % para cordero). Por ello, se puede concluir que la variabilidad dentro de las diferentes especies no va a venir determinada por la humedad. Además, también se puede destacar que la humedad es más o menos similar si se comparan las diferentes especies. Todas varían entre el 72 y 75 %. La pequeña variabilidad obtenida en el porcentaje de humedad de las muestras se ve corroborado por lo publicado por Huff-Lonergan, E. (2010). Esta autora explica que el principal componente de las carnes es el agua y que suele representar un 75 % del peso del músculo. Sin embargo, también dice que durante la etapa *postmortem*, estos valores pueden variar entre el 65 y el 80 %.

De forma similar, los valores estadísticos obtenidos a la hora de analizar el contenido proteico de las muestras son bajos (2,00 % para pollo; 5,28 % para ternera; 7,65 % para cerdo y 1,64 % para cordero) y por lo tanto, la variabilidad tampoco va a estar determinada por este parámetro. Los datos obtenidos están en línea con lo publicado por Huff-Lonergan, E. (2010), que asegura que el porcentaje medio de contenido proteico de una muestra es el 18,5 % del peso del músculo aunque puede variar entre el 16 y 22 %. Por lo tanto, en ambos

casos, los resultados están dentro de los valores habituales recogidos en la bibliografía.

Por último, aunque sin realizar ningún análisis estadístico ya se podía observar que las variaciones en el contenido lipídico dentro de una misma especie eran elevadas, se confirmó mediante el cálculo de la desviación típica relativa. Este parámetro toma valores elevados en todas especies, principalmente en ternera (55,78 %) y cordero (64,02 %). La variabilidad existente en el contenido en lípidos de las muestras dentro de una misma especie, puede atribuirse a diversos factores que modifican el contenido lipídico de la carne.

En primer lugar, hay que tener en cuenta que la cantidad de grasa que tiene una muestra viene determinada por el sexo del animal. La carne de cerdo de animales castrados tiene mayor capacidad de presentar carnes infiltradas que las hembras y los machos. Estas diferencias apreciadas entre sexos varían en función de la raza, la edad y la calidad y forma de racionamiento del pienso (Galián, M., 2007). Según Nürnberg, K. *et al.* (1998) en los cerdos el efecto del sexo en el contenido graso no es muy relevante. Sin embargo, los machos presentaban una capa de grasa subcutánea más fina como consecuencia de las diferencias existentes en el metabolismo hormonal entre machos y hembras. De forma muy parecida, Vestergaard, M. *et al.* (2007) compararon tres grupos de vacas y encontraron que los animales que tenían una capa lipídica extramuscular más gruesa también presentaban un mayor contenido de grasa intramuscular.

Otro de los factores que modifica el contenido lipídico es la edad de sacrificio, ya que afecta al grado de engrasamiento de la canal y la carne (Daszkiewicz, T. *et al.*, 2004; Asenjo, B. *et al.*, 2005; Fischer, K. *et al.*, 2006), siendo directamente proporcionales. Además según aumenta la edad de sacrificio aumenta el contenido en tejido adiposo y el grosor del tejido graso subcutáneo (Hugo, A. y Root, E., 2007).

Por último, el otro factor que afecta a la variación del contenido lipídico de las muestras de carne es la alimentación y el sistema de explotación usado. Fernández, X. *et al.*, (1995) explican que un exceso de alimentación incrementa el contenido de grasa intramuscular. Sin embargo, si los animales se encuentran privados de alimento, la lipólisis puede producir una reducción de la misma.

Por todo ello, la variabilidad del contenido lipídico de las muestras puede estar causada por el sexo del animal, la edad de sacrificio, la alimentación y el sistema de producción usado.

Por otro lado, se abordará por separado los resultados obtenidos de las muestras de potro y toro dado que son especies animales que no son consumidas tan ampliamente como las anteriores. Además, el proceso de producción de carne de potro no se encuentra muy estandarizado y los toros son animales que no se crían para el consumo de su carne sino para la obtención de comportamiento para la lidia.

En el caso de la carne de potro, se analizó 5 muestras pertenecientes a 5 animales distintos. Su composición química (Tabla 8) es muy semejante en humedad y proteína, lo que se pone de manifiesto por el valor bajo de su desviación típica relativa. Sin embargo, la composición lipídica varía entre 3,4 % y 6,4 %, teniendo una desviación típica relativa del 24,4 %. Esta variabilidad concuerda con los resultados publicados por Devic, B. y Stamenkovic, T. (1989) y Pomianowski, J.F. *et al.* (1994), quienes demostraron que el contenido en grasa de la carne de caballo varía entre el 3,1 % y 5,4 %, porcentajes no muy alejados de los nuestros. Según Sarriés, M.V. y Beriain, M.J. (2005), existen dos edades a las que se sacrifican los potros: a los 16 y 24 meses de edad. Por lo tanto, estas diferencias pueden deberse a la diferencia de edad en el sacrificio porque los potros sacrificados con 24 meses tendrán valores de grasa más elevados que los sacrificados a los 16 meses, ya que los animales de 24 meses son 9 meses mayores cuando son trasladados para acabar de forma intensiva y esto puede incrementar la proporción de grasa en el músculo, como han demostrado diversos autores que sucede en la carne de ternera (Szücs, E. *et al.*, 1987; Duckett, S.K. *et al.*, 1993). Otra posible razón que justificase la variabilidad existente sería debido al efecto del sexo ya que las muestras de potro provienen de ambos sexos y las hembras suelen tener mayor tendencia al engrasamiento. Sin embargo, Sarriés, M.V. y Beriain, M.J. (2005) demostraron en su estudio que el sexo del potro no influye significativamente en el contenido graso de su músculo. Esta diferencia en el resultado puede explicarse porque estas autoras utilizaron dos lotes de 15 animales, uno de cada sexo, y en este trabajo las muestras han sido suministradas por Carnicerías Goñi, pudiendo provenir de ambos sexos.

Tabla 8. Composición química muestras de carne de potro.

Nº de animal	% humedad	% proteína	% de grasa
2	70,9	24,7	3,4
3	71,9	24,4	4,5
4	72,1	22,4	6,3
5	70,0	23,4	6,4
6	71,9	23,1	5,5
\bar{x}	71,4	23,6	5,2
σ_{n-1}	0,9	0,9	1,3
RSD (%)	1,3	4,0	24,4

En el caso del toro, se analizó 6 animales pertenecientes a la misma ganadería que habían sido sacrificados en una misma lidia. Su composición química (Tabla 9), al igual que en las muestras de potro, era muy parecida en cuanto a proteína y humedad, teniendo una desviación típica relativa baja (3,2 % y 1,6 % respectivamente), mientras que existían mayores diferencias en el porcentaje de grasa, presentando además, una desviación típica relativa del 44 %. Este valor, es aproximadamente el doble del que presentan las muestras de potro.

Tabla 9. Composición química muestras de carne de toro de lidia.

Nº de animal	% humedad	% proteína	% de grasa
1	74,0	23,0	2,1
2	72,5	23,2	3,4
3	73,1	24,1	1,9
4	74,1	22,6	2,3
5	71,2	23,1	4,7
6	71,7	21,9	5,3
\bar{x}	72,8	23,0	3,3
σ_{n-1}	1,2	0,7	1,4
RSD (%)	1,6	3,2	43,9

Como señalan Beriain, M.J. *et al.* (2011) en su estudio, hay que tener en cuenta que los toros de lidia son animales enteros de entre 4 y 5 años que han sido criados en extensivo. Además, poseen un gran porcentaje de músculo dado que han sido criados para poder llevar a cabo un gran esfuerzo durante las corridas. Sin embargo, el contenido lipídico es inferior al obtenido con otros sistemas de

producción (Eichhorn J.M. *et al.*, 1985), en los que varía entre el 5 y 12 %. Las diferencias pueden deberse al hecho de que el sistema de cría de los toros de lidia tiende a producir poco marmoleado (grasa intramuscular). Este hecho, puede ser beneficioso ya que los consumidores españoles demandan canales magras y músculos con poca cantidad de marmoleado (Verbeke, W. y Vackier, I., 2004).

2. Adaptación del método analítico para análisis de muestras de carne mediante FTIR. Puesta a punto.

El objetivo principal del presente trabajo ha sido desarrollar un método que sirviese para analizar de forma rápida muestras de carne sin apenas alterar las mismas. Debido a la complejidad química de las muestras de carne y a los diferentes coeficientes de absorción de los distintos grupos funcionales, se realizaron estudios preliminares donde se investigó la proporción de carne en las pastillas de forma que se obtuvieran bandas bien resueltas, sin saturar el detector y con ruido de línea base mínimo.

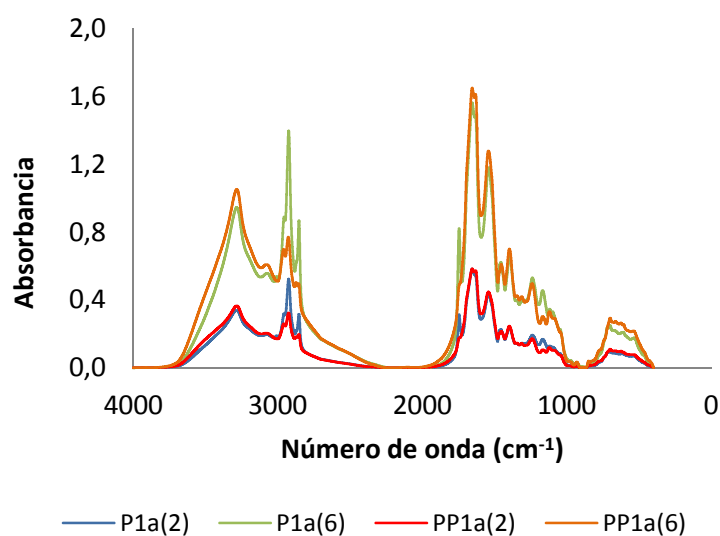


Figura 29. Espectro de muestras de 2 y 6 mg de carne de pavo (P) y pechuga de pollo (PP).

La Figura 29 muestra los espectros FTIR de muestras de carne de pavo y pechuga de pollo. De cada muestra se hicieron dos réplicas con concentraciones de carne en las pastillas de KBr de 1 % y 3 %, aunque la masa total de cada

pastilla fue de 200 mg en cada caso. Los espectros presentan bandas de absorción que aparecen a unos números de onda similares, pero difieren en la intensidad de la señal. De forma general, cuando se compara la absorbancia de un determinado número de onda, se observa que la intensidad de la señal de las muestras de carne preparadas con 6 mg de carne es aproximadamente el triple que en las muestras preparadas con 2 mg de carne. En otras palabras, se cumple la Ley de Lambert-Beer (Karoui, R. *et al.*, 2010).

Por otro lado, como ya se explicó en el capítulo de material y métodos, de cada muestra se realizaron dos réplicas para validación y comprobación del funcionamiento del método. Como se puede observar de forma visual en la Figura 30, la repetibilidad del método es alta ya que los espectros de la misma muestra son semejantes, pudiendo variar a algunas longitudes de onda. Estas posibles variaciones se deben a que la carne es una matriz heterogénea. A pesar de ello, se intentó homogeneizar al máximo para obtener las muestras más representativas posibles y de ahí, que los espectros sean semejantes.

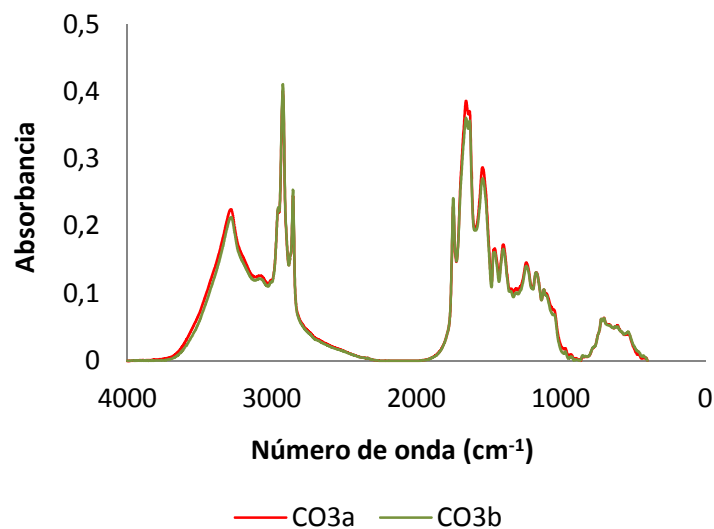


Figura 30. Espectros de las repeticiones de unas muestras de cordero.

Como comprobación de lo que habíamos observado visualmente, se procedió al análisis estadístico de los espectros. Para ello, se eligieron los valores de absorbancia máximos de algunas bandas de mayor intensidad y se calculó la media, la desviación típica y la desviación típica relativa entre los valores de ambos espectros (Tabla 10). Todos los valores de desviación típica relativa son

inferiores al 5 %, variando entre el 0,13 % y 4,80 % por lo que, se puede concluir que los espectros son semejantes entre sí.

Tabla 10. Media, desviación típica y desviación típica relativa de los espectros de las muestras de cordero.

Número de onda (cm ⁻¹)	Absorbancia CO3a	Absorbancia CO3b	$\bar{\chi}$	σ_{n-1}	RSD (%)
3288	0,225	0,213	0,219	0,009	3,89
2925	0,400	0,411	0,406	0,008	1,86
1656	0,386	0,361	0,374	0,018	4,80
1465	0,165	0,160	0,163	0,003	1,83
1238	0,146	0,141	0,143	0,003	2,43
1116	0,105	0,106	0,106	0,000	0,13
721	0,062	0,062	0,062	0,000	0,78

3. Asignación de las bandas representativas de los espectros FTIR de las carnes.

En la Figura 31 se presentan los espectros FTIR correspondientes a 5 diferentes especies animales (pollo, pavo, cerdo, cordero y ternera), obtenidos a partir de pastillas que contenían 2 mg de carne dispersados en 198 mg de KBr. En estos espectros se encuentran dos zonas diferenciadas. La primera de ellas, entre aproximadamente 3750 cm⁻¹ y 2750 cm⁻¹, que corresponde a modos de vibración de enlaces que contienen átomos de hidrógeno como C-H, O-H y N-H. La segunda zona, se extiende desde aproximadamente 1900 cm⁻¹ hasta 400 cm⁻¹ y se atribuye a distintos modos de flexión y torsión de los enlaces. Esta última zona, incluye la región denominada como huella dactilar que abarca desde 1500 cm⁻¹ hasta 400 cm⁻¹ (Al-Jowder, O. *et al.*, 1999; Karoui, R. *et al.*, 2010).

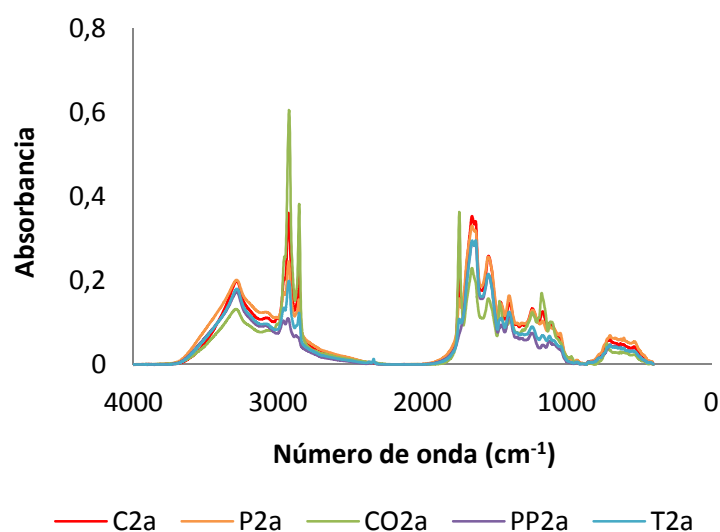


Figura 31. Espectro FTIR de 5 muestras de carne: cerdo (C2a), pavo (P2a), cordero (CO2a), pollo (PP2a) y ternera (T2a).

Como se puede observar en esta figura, las muestras de carne procedentes de las diferentes especies presentan bandas de absorción que aparecen en números de onda similares con variación en las intensidades de absorción. Por lo tanto, una primera conclusión es que las muestras de carne poseen enlaces similares en los componentes básicos pero varía la proporción en las que estos se encuentran en ellas. La Tabla 11, resume la asignación de las bandas más relevantes de los espectros.

Tabla 11. Asociación de las longitudes de onda con los grupos funcionales.

Longitud de onda (cm ⁻¹)	Grupo funcional	Referencia bibliográfica
3288	Vibración de extensión de N-H	(21; 48)
3006	CH vibración de extensión del doble enlace cis =CH; ácidos grasos insaturados	(7; 45; 94; 103)
2925	C-H vibración de extensión simétrica y asimétrica de CH ₂ and CH ₃ ; grupos alifáticos	(7; 48; 94; 103)
2854	C-H vibración de extensión simétrica y asimétrica de CH ₂ and CH ₃ ; grupos alifáticos	(7; 48; 94; 103)
1746	C=O vibración de extensión de los esteroides; ácidos grasos libres	(7; 45; 79; 94; 103)
1657	N-H vibración de extensión; proteínas	(103)
	C=C vibración de extensión; alquenos (cis)	(94; 103)
	Bandas de proteína amida I (C=O vibración de extensión)	(21; 48; 73; 79; 118)
1542	Amida II (N-H vibración de flexión mezclado con C-N vibración de extensión)	(1; 48; 73; 79)
1465	C-H vibración de flexión (tijereteo)	(1; 7; 48; 73; 79; 94)
1379	COO ⁻ vibración de extensión de los ácidos grasos y de las cadenas laterales de los aminoácidos.	(48; 73; 94)
1239	CN vibración de extensión; NH vibración de flexión	(21; 48; 79)
1162	C-O vibración de extensión y C-H vibración de flexión	(7; 48; 73)
1117	-CH vibración de flexión y -CH vibraciones de deformación de los ácidos grasos	(94)
721	C-H superposición de CH ₂ vibrando en oscilación y las vibraciones fuera del plano; alquenos (cis)	(7; 94; 103)

En torno a 3288 cm⁻¹ aparece una banda ancha, de intensidad media que corresponde a la vibración de extensión de los enlaces N-H. Estos enlaces son característicos de los aminoácidos de las proteínas. En presencia de agua,

cuando el secado de las muestras ha sido incompleto, la banda del enlace N-H solapa con la señal correspondiente a los enlaces hidroxilo O-H del agua.

Las diferentes bandas que aparecen alrededor de 3000 cm^{-1} se asignan a distintos modos de vibración del enlace C-H. Así, la señal de baja intensidad que se observa aproximadamente a 3006 cm^{-1} se asocia con la vibración C-H del doble enlace C=CH en posición *cis* de ácidos grasos insaturados. Las señales alrededor de 2925 cm^{-1} y 2856 cm^{-1} se atribuyen a las vibraciones de tensión asimétrica y simétrica de los enlaces CH de los grupos metilo (CH_3) y metileno (CH_2) de las cadenas carbonadas de las proteínas y de los ácidos grasos.

En la zona $2000\text{-}450\text{ cm}^{-1}$ destacan varias bandas. Un pico estrecho aproximadamente en 1746 cm^{-1} asociado con los modos de vibración de extensión del enlace carbonilo (C=O) presente en ésteres y ácidos grasos libres. La banda alrededor de 1657 cm^{-1} se atribuye a la vibración N-H de los grupos aminos de las proteínas y a los modos de vibración de extensión del doble enlace C=C de los alquenos. La banda presente aproximadamente en 1542 cm^{-1} viene asociado con las denominadas amidas II, en el que se mezcla la vibración de flexión del enlace N-H con la extensión del enlace C-N.

A partir de este último pico el resto de bandas presentan menor intensidad de absorción que las anteriormente nombradas. Sin embargo, no por ello dejan de ser importantes. El pico que aparece aproximadamente en 1465 cm^{-1} se asocia con una vibración de flexión denominada tijereteo perteneciente a los enlaces C-H. La banda alrededor de 1379 cm^{-1} se asocia con el grupo carboxilo (COO^-) presente en los ácidos grasos y en las cadenas laterales de los aminoácidos. El pico situado aproximadamente en 1239 cm^{-1} se asocia con dos grupos funcionales distintos. Por un lado con la vibración de extensión del enlace C-N y por otro lado, con la vibración de flexión de los enlaces N-H. De igual forma, el pico presente alrededor de 1162 cm^{-1} puede asociarse con la vibración de extensión del enlace C-O y con la vibración de flexión de los enlaces C-H. Aproximadamente en 1117 cm^{-1} , aparece un pico relacionado con la vibración de flexión y deformación del grupo $-\text{CH}$ presentes en los ácidos grasos.

Desde 1000 cm^{-1} hasta 400 cm^{-1} , existen un gran número de picos, muy juntos entre sí y de menor intensidad de absorción. Entre todos ellos destaca el pico situado alrededor de 721 cm^{-1} por su mayor intensidad de absorción en

comparación con el resto. Este pico surge como consecuencia de la superposición del enlace C-H con el grupo metileno (CH_2) vibrando en oscilación y fuera del plano. Estos enlaces presentan una conformación *cis* que suele encontrarse en los alquenos.

Asociación de los picos de absorbancia con el contenido graso y lipídico de las muestras.

Para confirmar la asignación de las bandas con los enlaces de los componentes de las carnes se analizó grasa procedente de distintas especies animales y una muestra de proteína procedente de un concentrado de albumina de suero bovino con una pureza mínima del 96 %. En la Figura 32 se pueden observar los espectros FTIR correspondientes a muestras de grasa de potro (GPT2a) y de proteína (A1a). Estos espectros han sido normalizados para conseguir que todos estén en la misma escala y la comparación entre ellos sea sencilla. Esta normalización se ha realizado dividiendo todos los valores de intensidad de absorbancia de una muestra entre su valor máximo, consiguiendo que la absorbancia varíe entre 0 y 1.

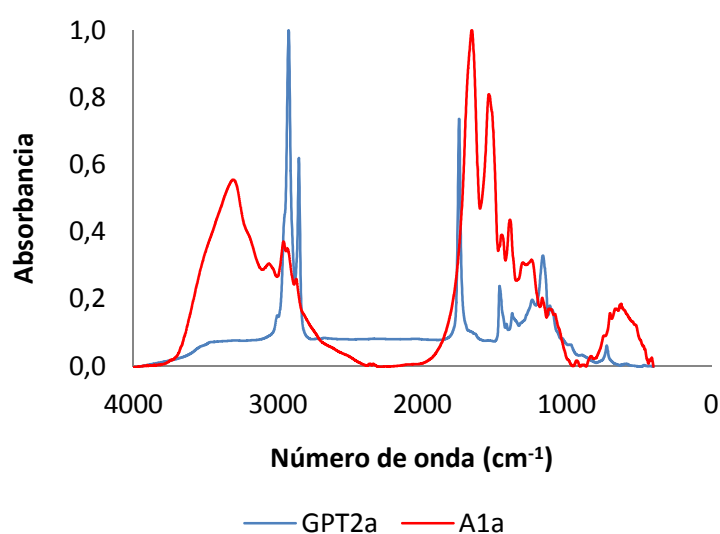


Figura 32. Espectros FTIR normalizados de grasa de potro (GPT2a) y de proteína (A1a).

En el espectro IR de la muestra de grasa de potro destacan las bandas estrechas que aparecen en torno a 2925 cm^{-1} , 2854 cm^{-1} y 1746 cm^{-1} . Los números de onda coinciden con la asignación encontrada en la bibliografía (Guillén, M.D. y Cabo,

N., 2000; Arce, L. *et al.*, 2009; Shiroma, C. y Rodriguez-Saona, L., 2009; Rohman, A. *et al.*, 2011; Papadopoulou, O. *et al.*, 2011; Hernández-Martínez, M. *et al.*, 2013). En el espectro IR obtenido con la muestra de proteína las bandas más intensas aparecen entorno a 3288 cm^{-1} , 1657 cm^{-1} y 1542 cm^{-1} , lo que también coincide con la bibliografía (Wu, D. *et al.*, 2008; Shiroma, C. y Rodriguez-Saona, L., 2009; Carbonaro, M. y Nucara, A., 2010; Meza-Márquez, O.G. *et al.*, 2010; Rohman, A. *et al.*, 2011; Papadopoulou, O. *et al.*, 2011; Hernández-Martínez, M. *et al.*, 2013).

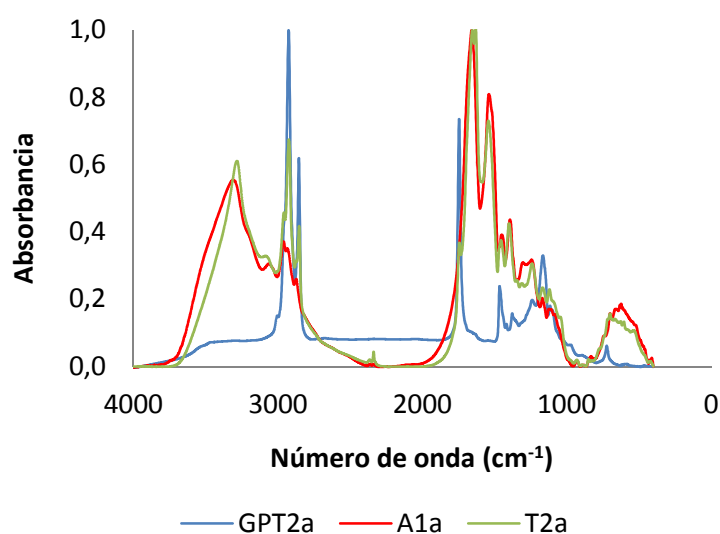


Figura 33. Espectro FTIR normalizados de muestras de grasa (GPT2a), proteína (A1a) y carne de ternera (T2a).

En la Figura 33, se muestra también el espectro de absorbancia normalizado de una muestra de carne de ternera y como se puede observar es más complejo que el de la grasa y la proteína ya que posee un mayor número de picos o bandas de absorción. Esto se debe a que el espectro producido por la carne es la suma de los picos producidos por los distintos tipos de vibración de los enlaces característicos de la grasa y proteína. Por otro lado, se puede observar que las bandas que aparecen entre 3500 cm^{-1} y 3000 cm^{-1} pueden ser asociadas con las proteínas ya que se encuentran ausentes en la muestra de grasa. Esta relación viene a confirmar lo encontrado durante la revisión bibliográfica (Carbonaro, M. y Nucara, A., 2010; Hernández-Martínez, M. *et al.*, 2013), donde se asociaba estos picos con enlaces presentes en las proteínas. De igual forma, los picos que se observan entre 3000 cm^{-1} y aproximadamente 1746 cm^{-1} pueden asociarse con

la grasa ya que estos no aparecen en el espectro de absorción de la proteína. En este caso, esta relación obtenida de forma gráfica viene a corroborar lo encontrado en la bibliografía ya que en ella se decía que estas bandas aparecían debido a la presencia de enlaces presentes en los ácidos grasos (C=O; C-H de CH₃ y CH₂) (Guillén, M.D. y Cabo, N., 2000; Shiroma, C. y Rodríguez-Saona, L., 2009; Arce, L. *et al.*, 2009; Rohman, A. *et al.*, 2011; Papadopoulou, O. *et al.*, 2011; Hernández-Martínez, M. *et al.*, 2013). Por último, existen otros dos picos (aproximadamente en 1657 cm⁻¹ y 1542 cm⁻¹) que pueden asociarse con las proteínas porque el espectro de absorción de la muestra de grasa de potro no los presenta. Mediante la revisión bibliográfica, se había asociado estos picos con los grupos denominados amida I y amida II (Wu, D. *et al.* (2008); Shiroma, C. y Rodríguez-Saona, L., 2009; Meza-Márquez, O.G. *et al.*, 2010; Carbonaro, M. y Nucara, A., 2010; Rohman, A. *et al.*, 2011; Papadopoulou, O. *et al.*, 2011; Hernández-Martínez, M. *et al.*, 2013; Alamprese, C. *et al.*, 2013). El resto de picos que aparecen en los espectros de absorción no pueden ser asociados gráficamente ya que aparecen tanto en el espectro de absorción de la grasa como en de la proteína. Por lo que, mediante este método no se puede confirmar las asociaciones realizadas en la revisión bibliográfica respecto a éstas longitudes de ondas.

Por último, para completar la asignación de bandas se realizó un análisis de correlación, tomando la absorbancia de las bandas más relevantes de los espectros correspondientes a los distintos tipos de carne. La Tabla 12 muestra la matriz de correlación que incluye los coeficientes correspondientes. Un coeficiente de correlación próximo a 1 indica que cuando la intensidad de una banda aumenta, también aumenta la señal de la otra banda. Por tanto, suelen ser diferentes modos de vibración de un mismo enlace o unidad estructural. Un coeficiente de correlación negativo cercano a -1 refleja que el aumento de una señal coincide con la disminución de la otra señal comparada. En ningún caso debe entenderse correlación como sinónimo de causalidad.

Tabla 12. Coeficientes de correlación de la variación de absorbancia de las bandas más relevantes de los espectros FTIR para las distintas muestras de carne.

	3288	3006	2925	2854	1746	1657	1542	1465	1379	1239	1162	1117	721
3288	1												
3006	0,26	1											
2925	-0,04	0,54	1										
2854	-0,04	0,51	0,96	1									
1746	-0,18	0,62	0,96	0,90	1								
1657	0,97	0,35	0,06	0,11	-0,07	1							
1542	0,99	0,30	-0,01	0,03	-0,14	0,99	1						
1465	0,54	0,53	0,77	0,72	0,66	0,58	0,55	1					
1379	0,60	0,42	0,49	0,46	0,39	0,66	0,64	0,70	1				
1239	0,52	0,59	0,78	0,70	0,70	0,57	0,55	0,94	0,78	1			
1162	0,03	0,55	0,96	0,87	0,94	0,09	0,04	0,83	0,51	0,84	1		
1117	0,30	0,57	0,87	0,90	0,80	0,41	0,33	0,90	0,62	0,84	0,86	1	
721	0,66	0,49	0,49	0,44	0,39	0,70	0,68	0,80	0,90	0,81	0,55	0,66	1

En un primer análisis, se realizó una matriz de correlación con todas las muestras analizadas, es decir, todas las especies estudiadas (Tabla 12). En esta matriz se pueden observar diversas correlaciones. En primer lugar, la banda que aparece alrededor de 3288 cm^{-1} correlaciona positivamente con 1657 cm^{-1} (0,97) y 1542 cm^{-1} (0,99). Esta correlación es la misma que se ha observado mediante el análisis de los espectros de forma gráfica y que se ha asociado con la composición proteica presente en la muestras. Por tanto, estas bandas se pueden atribuir a distintos modos de vibración de los grupos aminos de las proteínas. Por otro lado, la señal presente aproximadamente en 2925 cm^{-1} correlaciona con 2854 cm^{-1} (0,96), 1746 cm^{-1} (0,96), 1162 cm^{-1} (0,96) y 1117 cm^{-1} (0,90). La parte inicial de la correlación también había sido observada de forma gráfica y asociada con la composición lipídica de la muestra. Sin embargo, esta correlación añade dos longitudes de ondas nuevas (1162 cm^{-1} y 1117 cm^{-1}), que por lo tanto, pueden relacionarse de igual forma con la composición lipídica de las muestras. Esta nueva asociación vendría a confirmar la relación encontrada durante la revisión bibliográfica, en las que estas bandas se asocian con enlaces característicos de los ácidos grasos de los lípidos (Arce, L. *et al.*, 2009; Meza-Márquez, O.G. *et al.*, 2010; Rohman, A. *et al.*, 2011; Hernández-Martínez, M. *et al.*, 2013;).

De igual forma, la banda presente alrededor de 1465 cm^{-1} correlaciona positivamente con 1239 cm^{-1} (0,94) y 1117 cm^{-1} (0,90). Esta correlación no se había podido determinar de forma gráfica. Sin embargo, hay que destacar que pese a que 1117 cm^{-1} aparece en la anterior correlación, las otras longitudes de onda no lo hacen, por lo que se considera que no se puede asociar de forma clara ni al contenido en grasa ni en proteína de las muestras. Esta conclusión concuerda con lo obtenido mediante la revisión bibliográfica donde no existe una asociación clara ni con la grasa ni con la proteína de la carne. Por último, el pico situado aproximadamente en 1379 cm^{-1} correlaciona con 721 cm^{-1} , siendo el coeficiente de correlación de 0,90. Esta correlación tampoco había sido observada anteriormente y además, ambas longitudes de onda no se encuentran en ninguna de las relaciones anteriores. Igualmente, en ninguno de los trabajos realizados por otros autores se había encontrado ninguna asociación de estas bandas ni con la grasa ni con la proteína de las muestras.

Por lo tanto, a modo de resumen podemos decir que las bandas que aparecen aproximadamente en 3288 cm^{-1} , 1657 cm^{-1} y 1542 cm^{-1} se encuentran relacionados entre sí y pueden atribuirse con modos de vibración de los grupos aminos de las proteínas. De forma similar, se puede decir que los picos presentes alrededor de 2925 cm^{-1} , 2854 cm^{-1} , 1746 cm^{-1} , 1162 cm^{-1} y 1117 cm^{-1} también se encuentran relacionados entre sí y se asocian con la vibración de los enlaces característicos de los ácidos grasos. Por otro lado, mediante el análisis por matrices de correlación se forman dos grupos de picos que correlacionan positivamente entre sí. Por un lado, la banda presente aproximadamente en 1465 cm^{-1} se correlaciona con 1239 cm^{-1} y 1117 cm^{-1} . Y el pico presente alrededor de 1379 cm^{-1} correlaciona positivamente con la banda presente en 721 cm^{-1} . Sin embargo, por ninguna de los métodos utilizados hasta el momento, ha sido posible su asociación ni al contenido en grasa ni en proteína de las muestras. En la Figura 34 se muestra el espectro de absorbancia de una muestra de cerdo donde se señalan los enlaces que dan lugar a las bandas que aparecen a los números de onda más representativos.

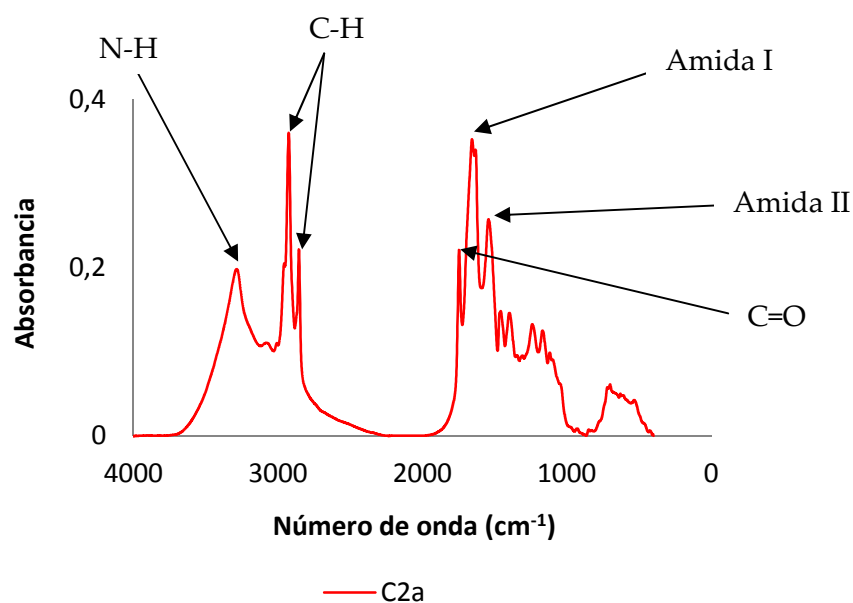


Figura 34. Espectro FTIR de una muestra de cerdo con la asociación de los enlaces con las bandas de absorción.

Correlación de las intensidades de absorbancia con la composición química de las muestras de carne.

Debido a la ausencia de una asociación clara de algunas longitudes de onda con el contenido lipídico y proteico de las muestras, se realizó una matriz de correlación intentando relacionar las intensidades de absorción de las bandas relevantes con el porcentaje de humedad, lípidos y proteínas de las muestras. Estos datos se habían obtenido mediante el análisis químico de las muestras tal y como se ha descrito en el capítulo de material y métodos.

En la Tabla 13 se presentan los coeficientes de correlación correspondientes al análisis de todas las muestras de las que se conoce su composición química mediante los métodos de análisis químico. En esta matriz, se puede observar distintos aspectos. Por un lado, se mantienen algunas de las correlaciones que ya habían sido señaladas en la matriz anterior, aunque en algunos casos sus coeficientes se han visto modificados. En primer lugar, la banda presente alrededor de 3288 cm^{-1} correlaciona positivamente con 1657 cm^{-1} (0,95) y 1542 cm^{-1} (0,97). En segundo lugar, el pico que aparece aproximadamente en 2925 cm^{-1} correlaciona con 2854 cm^{-1} (0,96), 1746 cm^{-1} (0,98), 1162 cm^{-1} (0,96) y 1117 cm^{-1}

(0,92). En tercer lugar, la banda alrededor de 1465 cm^{-1} correlaciona con 1239 cm^{-1} (0,93) y 1117 cm^{-1} (0,93) como ocurría en la matriz anterior (Tabla 12). Sin embargo, en esta asociación de picos se incluye una nueva longitud de onda (1162 cm^{-1}) que correlaciona positivamente (0,90). También hay que señalar que la última de las correlaciones que aparecían en la anterior matriz (1379 cm^{-1} con 721 cm^{-1}), ha desaparecido de ésta.

Por otro lado, cabe destacar que aunque tanto de forma gráfica como mediante la revisión bibliográfica habíamos relacionada la primera de las correlaciones con la parte proteica de las muestras (Wu, D. *et al.* (2008); Shiroma, C. y Rodríguez-Saona, L., 2009; Meza-Márquez, O.G. *et al.*, 2010; Carbonaro, M. y Nucara, A., 2010; Rohman, A. *et al.*, 2011; Papadopoulou, O. *et al.*, 2011; Hernández-Martínez, M. *et al.*, 2013; Alamprese, C. *et al.*, 2013) y la segunda de ellas con los lípidos (Guillén, M.D. y Cabo, N., 2000; Shiroma, C. y Rodríguez-Saona, L., 2009; Arce, L. *et al.*, 2009; Rohman, A. *et al.*, 2011; Papadopoulou, O. *et al.*, 2011; Hernández-Martínez, M. *et al.*, 2013), mediante esta matriz no se obtiene ninguna correlación positiva. Para poder determinar cuál era la causa de que no apareciesen correlaciones con la composición química de las muestras, se realizó una nueva matriz de correlación pero eliminando las muestras de carne de potro ya que como se ha explicado en el primer apartado de este capítulo, la variabilidad existente en el contenido lipídico de las mismas era elevada (RSD=24,4 %).

Tabla 13. Coeficientes de correlación de la variación de absorbancia de las bandas más relevantes de los espectros FTIR para las distintas muestras de carne, incluyendo la composición química.

	3288	3006	2925	2854	1746	1657	1542	1465	1379	1239	1162	1117	721	Humedad	Proteína	Grasa
3288	1															
3006	0,37	1														
2925	-0,13	0,55	1													
2854	-0,08	0,53	0,96	1												
1746	-0,16	0,59	0,98	0,92	1											
1657	0,95	0,47	0,02	0,13	-0,02	1										
1542	0,97	0,42	-0,08	0,01	-0,11	0,99	1									
1465	0,35	0,61	0,83	0,79	0,81	0,42	0,36	1								
1379	0,38	0,47	0,53	0,52	0,52	0,49	0,45	0,61	1							
1239	0,32	0,65	0,84	0,77	0,85	0,40	0,35	0,93	0,72	1						
1162	-0,03	0,57	0,96	0,86	0,97	0,05	-0,03	0,90	0,55	0,91	1					
1117	0,23	0,62	0,88	0,92	0,85	0,38	0,27	0,93	0,61	0,86	0,90	1				
721	0,47	0,59	0,55	0,51	0,55	0,52	0,50	0,75	0,85	0,77	0,62	0,66	1			
Humedad	0,55	0,34	-0,16	-0,14	-0,18	0,50	0,48	0,23	-0,07	-0,03	-0,09	0,12	0,18	1		
Proteína	-0,11	-0,28	-0,40	-0,33	-0,40	-0,08	-0,04	-0,66	-0,08	-0,37	-0,51	-0,51	-0,37	-0,63	1	
Grasa	-0,53	-0,09	0,65	0,54	0,67	-0,50	-0,52	0,45	0,18	0,47	0,68	0,43	0,19	-0,53	-0,32	1

En la Tabla 14 se muestran los coeficientes de correlación que se han obtenido y como se puede observar, a pesar de que éstos sufren algunas modificaciones, las relaciones existentes entre las distintas intensidades de absorción no varían con respecto a las presentes en la matriz anterior (Tabla 13). Pero en esta nueva matriz, aparece por primera vez una correlación positiva entre el contenido lipídico de las muestras y los picos presentes alrededor de 2925 cm^{-1} (0,93), 2854 cm^{-1} (0,92) y 1746 cm^{-1} (0,92). Esto corrobora la relación que se había establecido mediante el análisis gráfico y la revisión bibliográfica, donde estas bandas de absorción se relacionaban con la vibración de los enlaces característicos de los lípidos (Guillén, M.D. y Cabo, N., 2000; Shiroma, C. y Rodríguez-Saona, L., 2009; Arce, L. *et al.*, 2009; Rohman, A. *et al.*, 2011; Papadopoulou, O. *et al.*, 2011; Hernández-Martínez, M. *et al.*, 2013).

Por último, se realizó una última matriz de correlación eliminando también las muestras de carne toro porque la variabilidad existente en el contenido lipídico de las mismas también era alta (RSD=43,9 %). Como se puede observar en la Tabla 15 se producen algunas modificaciones de las correlaciones entre las bandas de absorción. La correlación entre los picos presentes alrededor de 3288 cm^{-1} , 1657 cm^{-1} y 1542 cm^{-1} , se amplía con la inclusión de una correlación positiva con la banda que aparece en torno a 1379 cm^{-1} (0,90). La segunda de las relaciones, que es la correlación existente entre las bandas presentes alrededor de 2925 cm^{-1} , 2854 cm^{-1} , 1746 cm^{-1} y 1162 cm^{-1} , se ven modificadas con la eliminación del pico presente aproximadamente en 1117 cm^{-1} . Y en tercer lugar, vuelve a aparecer la correlación existente entre el pico presente en 1379 cm^{-1} y el de 721 cm^{-1} siendo su coeficiente de correlación de 0,92. En cuanto a las relaciones de las intensidades de absorción con la composición, se mantiene la relación existente entre los picos presentes en 2925 cm^{-1} , 2854 cm^{-1} y 1746 cm^{-1} con el contenido lipídico de las muestras. Además, en esta matriz aparece también una correlación positiva (0,90) con el pico presente en 1162 cm^{-1} . Esta nueva correlación estaría en concordancia con lo dicho en la revisión bibliográfica donde se dice que esa banda surge como consecuencia de las vibraciones de extensión de los enlaces C-O (Arce, L. *et al.*, 2009; Meza-Márquez, O.G. *et al.*, 2010; Hernández-Martínez, M. *et al.*, 2013).

Tabla 14. Coeficientes de correlación de la variación de absorbancia de las bandas más relevantes de los espectros FTIR para las distintas muestras de carne (excepto la muestras de carne de potro), incluyendo la composición química.

	3288	3006	2925	2854	1746	1657	1542	1465	1379	1239	1162	1117	721	Humedad	Proteína	Grasa
3288	1															
3006	-0,23	1														
2925	-0,17	0,74	1													
2854	-0,14	0,73	0,99	1												
1746	-0,34	0,83	0,96	0,95	1											
1657	0,96	-0,14	-0,01	0,01	-0,16	1										
1542	0,97	-0,16	-0,07	-0,05	-0,21	0,99	1									
1465	0,46	0,52	0,78	0,79	0,66	0,59	0,56	1								
1379	0,32	0,25	0,43	0,44	0,36	0,49	0,43	0,61	1							
1239	0,39	0,62	0,80	0,80	0,71	0,54	0,51	0,98	0,62	1						
1162	-0,06	0,76	0,99	0,99	0,95	0,10	0,05	0,85	0,49	0,87	1					
1117	0,25	0,67	0,89	0,90	0,81	0,41	0,36	0,97	0,63	0,98	0,94	1				
721	0,35	0,40	0,50	0,52	0,43	0,50	0,46	0,68	0,86	0,70	0,57	0,70	1			
Humedad	0,15	-0,43	-0,77	-0,77	-0,68	0,06	0,10	-0,56	-0,18	-0,53	-0,73	-0,63	-0,31	1		
Proteína	0,44	-0,80	-0,79	-0,77	-0,87	0,28	0,33	-0,43	-0,34	-0,51	-0,77	-0,60	-0,37	0,36	1	
Grasa	-0,39	0,70	0,93	0,92	0,92	-0,24	-0,30	0,56	0,23	0,59	0,88	0,71	0,34	-0,84	-0,80	1

Tabla 15. Coeficientes de correlación de la variación de absorbancia de las bandas más relevantes de los espectros FTIR para las distintas muestras de carne (excepto la muestras de carne de potro y toro), incluyendo la composición química.

	3288	3006	2925	2854	1746	1657	1542	1465	1379	1239	1162	1117	721	Humedad	Proteína	Grasa
3288	1															
3006	-0,43	1														
2925	-0,47	0,77	1													
2854	-0,44	0,76	0,99	1												
1746	-0,57	0,86	0,97	0,97	1											
1657	0,98	-0,31	-0,39	-0,37	-0,48	1										
1542	0,98	-0,30	-0,42	-0,39	-0,50	0,99	1									
1465	0,19	0,62	0,75	0,77	0,68	0,28	0,27	1								
1379	0,90	-0,07	-0,19	-0,16	-0,26	0,93	0,95	0,50	1							
1239	0,11	0,75	0,76	0,77	0,73	0,22	0,22	0,97	0,46	1						
1162	-0,37	0,83	0,99	0,99	0,97	-0,28	-0,30	0,83	-0,06	0,85	1					
1117	-0,04	0,77	0,87	0,88	0,84	0,06	0,05	0,96	0,29	0,98	0,94	1				
721	0,77	0,08	0,10	0,13	-0,03	0,78	0,79	0,70	0,92	0,62	0,21	0,50	1			
Humedad	0,30	-0,37	-0,79	-0,79	-0,70	0,28	0,31	-0,58	0,17	-0,52	-0,75	-0,66	-0,10	1		
Proteína	0,70	-0,81	-0,75	-0,73	-0,84	0,61	0,63	-0,34	0,46	-0,44	-0,73	-0,53	0,31	0,31	1	
Grasa	-0,62	0,70	0,94	0,93	0,94	-0,56	-0,58	0,56	-0,40	0,57	0,90	0,72	-0,13	-0,83	-0,78	1

Se cree que las matrices de correlación mejoran al eliminar las muestras de carne de toro y potro ya que estas muestras tienen mayor variabilidad en el contenido de materia grasa. Además, en el caso del potro la composición química de las muestras no se había llevado a cabo con el mismo trozo de carne que se había utilizado para analizar mediante espectroscopia MIR, ya que esta composición se había medido con anterioridad para otros análisis y estudios que se están llevando a cabo con los mismos ejemplares de potro. Por ello, se piensa que la composición química de las muestras analizadas mediante espectroscopia MIR no coincidía con la de las muestras empleadas para los análisis químicos. A parte de esta consideración de carácter práctico, hay que tener en cuenta, como ya se ha comentado anteriormente, la gran variabilidad existente en la composición química de las muestras de carne de toro y potro.

4. Estimación de la composición química de las muestras.

Otro de los objetivos de este trabajo final de carrera ha sido conseguir analizar la composición química de las muestras mediante espectroscopia MIR, un método rápido, sencillo y no destructivo (Wu, D. *et al.*, 2008). Para ello, se intentó establecer una relación entre el contenido lipídico y proteico de las muestras con las intensidades de absorción a determinadas longitudes de onda mediante rectas de regresión. Para obtener estas rectas se utilizaron todas las muestras de las que se conocía la composición química mediante métodos químicos de análisis excepto las muestras de carne de toro y potro, porque como ya se ha explicado en anteriores apartados, aportaban mucha variabilidad y los resultados obtenidos, no eran válidos. Los resultados de estos análisis se recogen en la Tabla 6 del Apartado 1 del Capítulo de Resultados y discusión.

4.1. Estimación del contenido lipídico de las muestras.

Como ya se ha explicado anteriormente, algunas de las longitudes de ondas características que se habían seleccionado, pueden ser asociadas de forma clara a uno de los dos componentes mayoritarios de la muestras, no teniendo en cuenta la humedad ya que las pastillas habían sufrido un proceso de desecación previo. Por ello, se obtuvieron las rectas de regresión del contenido lipídico con respecto a las intensidades de absorción a 2925 cm^{-1} (Figura 35) y 1744 cm^{-1} (Figura 36).

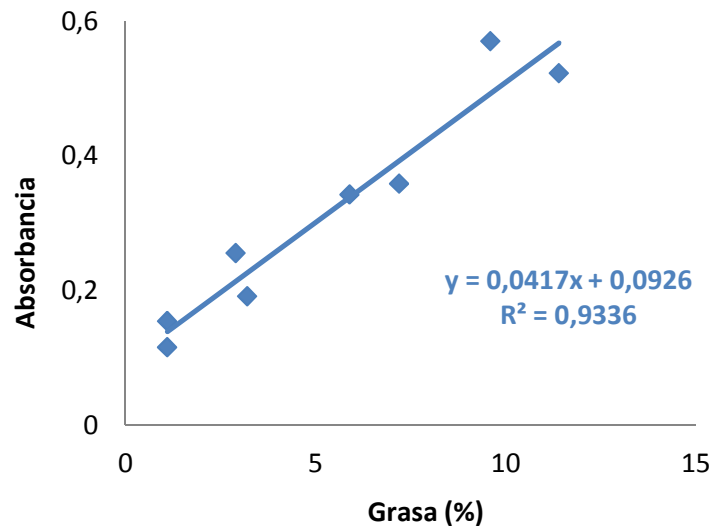


Figura 35. Recta de regresión de la absorción de radiación infrarroja a 2925 cm^{-1} en función del porcentaje de materia grasa de las muestras de carne.

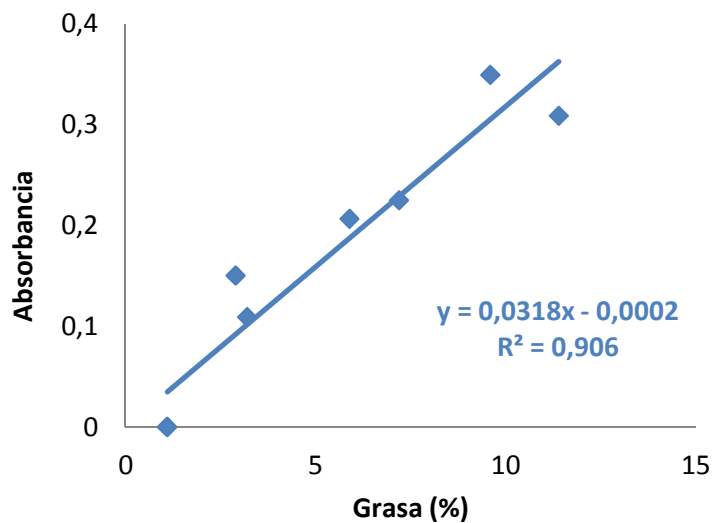


Figura 36. Recta de regresión de la absorción de radiación infrarroja a 1744 cm^{-1} en función del porcentaje de materia grasa de las muestras de carne.

En ambos casos, el mejor ajuste se obtiene con un modelo lineal, obteniendo así una ecuación de primer grado. Para que el ajuste de una recta de regresión pueda ser considerado como adecuado, el coeficiente de regresión cuadrático de la misma debe ser superior a 0,9. Como se puede observar, en la recta de regresión obtenida con las intensidades de absorción a 2925 cm^{-1} (Figura 35) el coeficiente de regresión cuadrático es de 0,9336. Por otro lado, el coeficiente de regresión cuadrático obtenido con las intensidades de absorción a 1744 cm^{-1}

(Figura 36) es de 0,906. Por lo tanto, ambos coeficientes son superiores a 0,90. Por ello, se cree que este método puede ser apropiado para estimar el contenido lipídico de las muestras de carne.

Validación del método de estimación del contenido lipídico mediante espectroscopia MIR.

Para corroborar la validez del método, se analizó unas nuevas muestras que no habían sido incluidas en estas rectas de regresión. Para ello, se analizó en total 8 muestras, dos de cada una de las siguientes especies animales: ternera, cordero, pollo (pechuga) y cerdo. Se eligió estos animales porque abarcaban desde las especies más grasas como el cordero hasta las menos grasas como el pollo.

El procedimiento seguido se describe a continuación. Primero se analizó mediante espectroscopia MIR las muestras y se obtuvieron las intensidades de absorción a 2925 cm^{-1} y 1744 cm^{-1} . Con estos datos, se usó las rectas de regresión, que se habían obtenido anteriormente (Figura 35 y 36), para estimar el contenido graso de los distintos tipos de carne. Por otro lado, se analizó la composición química de las muestras. Una vez recopilado ambos datos, se procedió a su comparación. Los resultados obtenidos, se muestran en la Tabla 16.

Tabla 16. Resultados del análisis de validación del método.

Tipo de carne	Muestra	Absorbancia 2925 cm ⁻¹	Media absorbancia 2925 cm ⁻¹	Grasa 2925 (teórica) (%)	Absorbancia 1744 cm ⁻¹	Media absorbancia 1744 cm ⁻¹	Grasa 1744 (teórica) (%)	Grasa (real) (%)	Valor relativo 2925 cm ⁻¹ (%)	Valor relativo 1744 cm ⁻¹ (%)
Pollo	PP3a	0,181	0,179	2,06	0,000	0,000	0,01	1,4	47,2	-99,6
	PP3b	0,176			0,000					
	PP4a	0,231			0,000					
	PP4b	0,151			0,000					
Cordero	CO3a	0,400	0,406	7,51	0,229	0,235	7,40	5,9	27,3	25,4
	CO3b	0,411			0,241					
	CO4a	0,206			0,129					
	CO4b	0,235			0,148					
Cerdo	C3a	0,275	0,307	5,14	0,174	0,191	6,02	4,5	14,2	33,7
	C3b	0,339			0,209					
	C4a	0,271			0,165					
	C4b	0,193			0,122					
Terñera	T3a	0,122	0,152	1,43	0,000	0,000	0,01	1,6	-10,7	-99,6
	T3b	0,182			0,000					
	T4a	0,153			0,000					
	T4b	0,127			0,000					

Como se puede observar, los resultados obtenidos mediante el análisis por espectroscopia MIR y su posterior transformación mediante la recta de regresión, varían de unas muestras a otras y de unas longitudes de onda a otras. Para poder tener un parámetro de comparación, se calculó el error relativo que se comete en cada una de las muestras, para lo cual se empleó la siguiente ecuación:

$$\text{Valor relativo (\%)} = \left(\frac{\text{Valor estimado} - \text{Valor real}}{\text{Valor real}} \right) \times 100$$

De forma general, se puede concluir que los resultados obtenidos con las intensidades de absorción a 2925 cm⁻¹ son mejores que los obtenidos con los datos de 1744 cm⁻¹, ya que los valores relativos calculados son inferiores para todas las muestras. En el caso de las estimaciones realizadas con las intensidades de absorción a 2925 cm⁻¹ se observa que las mayores diferencias encontradas son positivas (+95,7 %), siendo la menor de todas ellas negativa (-0,5 %). Sin embargo, en el caso de la otra longitud de onda (1744 cm⁻¹) los mayores valores relativos son negativos (-99,6 %). Aunque hay que señalar que en esta longitud de onda los mayores valores relativos obtenidos pertenecen a las muestras (pollo y ternera) que no presentan pico de absorción a dicha longitud de onda. Al no presentar este pico, este método estima que la composición lipídica es muy pequeña, casi nula, lo que no coincide con la realidad. Aunque sí que es verdad que aquellas muestras que no presentan dicho pico, son las que tienen menor contenido lipídico. De esta forma, se puede concluir que la mejor longitud de onda para el cálculo del contenido lipídico de las muestras es las intensidades de absorción a 2925 cm⁻¹.

4.2. Estimación del contenido proteico de las muestras.

De la misma forma que se había intentado desarrollar un método para estimar mediante espectroscopia de infrarrojo el contenido lipídico de las muestras, se intentó obtener otro sistema para conocer el contenido proteico de las mismas. Como se había señalado anteriormente existen una serie de bandas de absorción (3288 cm⁻¹, 1657 cm⁻¹ y 1542 cm⁻¹) que están asociadas de forma clara a enlaces característicos de las proteínas. Por ello, se intentó relacionar el pico que aparece en 3288 cm⁻¹ con la proteína de las muestras de las que se conocía su

composición química. Para poder establecer dicha relación se calculó mediante Excel 2010 su recta de regresión.

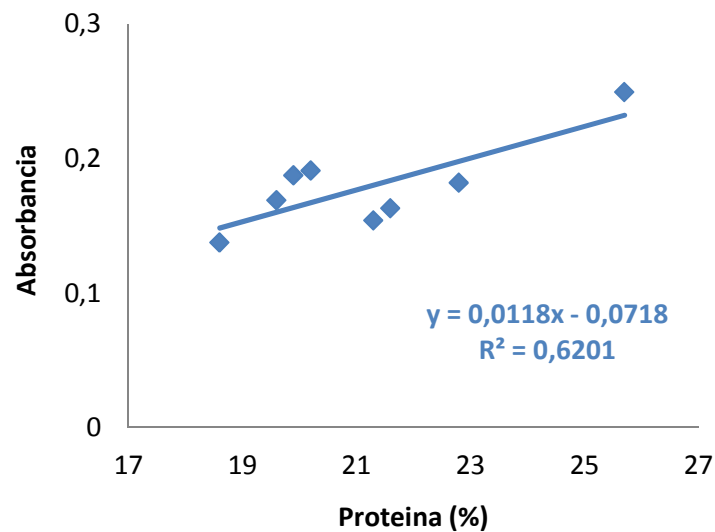


Figura 37. Recta de regresión de la absorción de radiación infrarroja a 3288 cm⁻¹ en función del porcentaje de proteína de las muestras de carne.

En la Figura 37 se puede observar la recta de regresión que relaciona el contenido proteico de las muestras con las intensidades de absorción medidas a 3288 cm⁻¹. Esta recta de regresión tiene un coeficiente de regresión cuadrático de 0,62 por ello, este método no podría ser utilizado para la estimación del contenido proteico de las muestras, ya que el error que se produciría sería muy elevado. Esto puede deberse a que la composición proteica de todas las muestras de carne es muy parecida mientras que las intensidades de absorción a 3288 cm⁻¹ son más variables.

Dado que los resultados obtenidos al analizar las intensidades de absorción a 3288 cm⁻¹ no eran óptimos, se intentó realizar la misma correlación con las intensidades de absorción a 1657 cm⁻¹ y 1542 cm⁻¹.

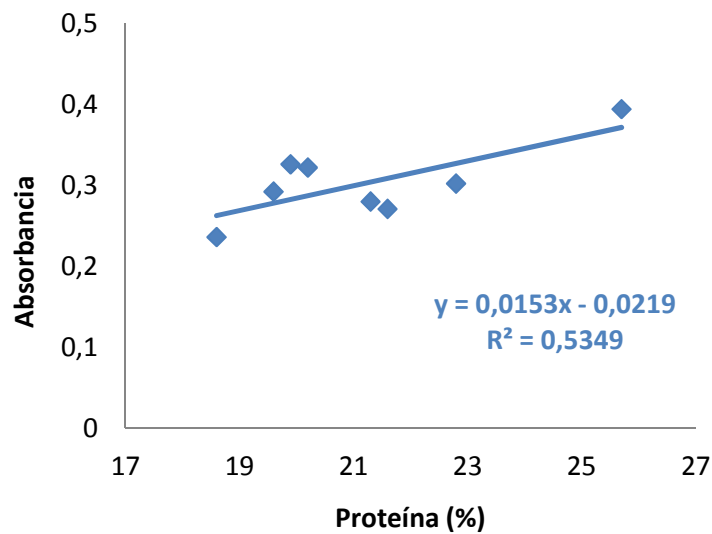


Figura 38. Recta de regresión de la absorbancia de radiación infrarroja a 1657 cm^{-1} en función del porcentaje de proteína de las muestras de carne.

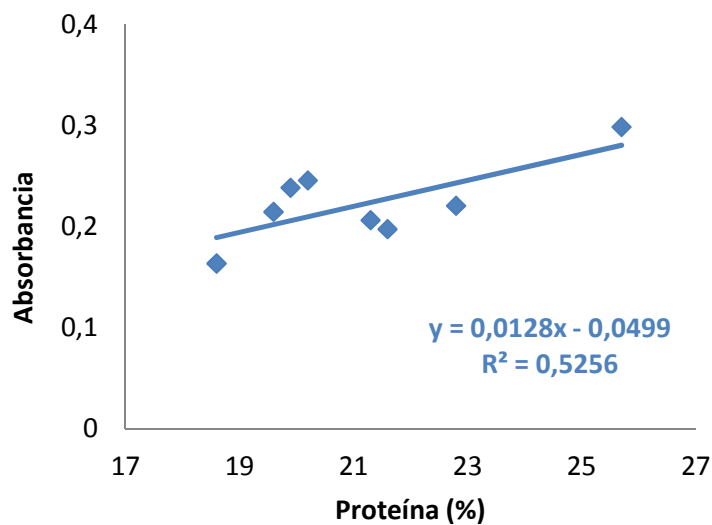


Figura 39. Recta de regresión de la absorbancia de radiación infrarroja a 1542 cm^{-1} en función del porcentaje de proteína de las muestras.

En las Figuras 38 y 39 se muestran la recta de regresión obtenida al trabajar con las intensidades de absorción de las distintas muestras a 1657 cm^{-1} y 1542 cm^{-1} respectivamente. En ambas rectas de regresión, los coeficientes de regresión

cuadráticos obtenidos son de 0,53. Como ya se ha comentado anteriormente, cuando este coeficiente toma valores inferiores a 0,9, no es adecuado utilizar la recta de regresión para calcular alguna de sus variables porque se cometen errores. Además, señalar que estos coeficientes de regresión cuadráticos son inferiores a los obtenidos con las intensidades de absorción a 3288 cm^{-1} .

Por lo tanto, según los resultados que se han obtenido, se puede concluir que las rectas de regresión obtenidas con los valores de absorbancia en función del porcentaje de proteína a 3288 cm^{-1} , 1657 cm^{-1} y 1542 cm^{-1} no permiten estimar el contenido proteico de las muestras de carne.

5. Empleo del Análisis de Componentes Principales (ACP) para la clasificación de las muestras por especies animales.

Como última etapa durante la realización de este trabajo final de carrera, se intentó clasificar las muestras analizadas por especies animales a partir de los datos de intensidad de absorción a diferentes longitudes de onda y del contenido en humedad, proteína y grasa obtenidos mediante análisis químicos. Para realizar esta clasificación se utilizó el Análisis de Componentes Principales (ACP). Los componentes principales son combinación lineales de las variables del sistema de forma que mediante este análisis se consigue reducir el número de variables empleadas.

En la Tabla 17, se recogen los números de onda cuyas intensidades de absorción fueron utilizados para el análisis de componentes principales. Como se puede observar, las longitudes de onda que se seleccionaron fueron las mismas que habían sido utilizadas para la realización de las matrices de correlación del apartado 3 de este capítulo. Además, como ya se ha dicho anteriormente, también se utilizaron los datos del porcentaje de humedad, proteína y grasa de las muestras. Por lo tanto, el número total de variables utilizadas fue 16. Dado que no todas las variables estaban en las mismas unidades, fue necesario realizar un proceso previo de normalización de los datos.

Tabla 17. Números de onda cuyas intensidades de absorción son utilizadas para la realización del Análisis de Componentes Principales (ACP).

Variable	Número de onda (cm ⁻¹)
A1	3288
A2	3006
A3	2925
A4	2854
A5	1746
A6	1657
A7	1542
A8	1465
A9	1379
A10	1239
A11	1162
A12	1117
A13	721

Por otro lado, para la realización de este análisis se utilizaron todas las muestras con composición química conocida excluyendo las muestras de la tanda de validación del método de estimación del contenido en lípidos. De esta forma, el número total de muestras utilizadas fue 19. Sin embargo, el número total de datos utilizados fue 38 ya que se incluyeron los valores obtenidos al realizar las dos repeticiones de cada muestra. Para la mejor comprensión del gráfico obtenido mediante este análisis, se asignó un código numérico a cada especie animal. En la Tabla 18 se recogen los códigos asignados a cada especie y el número de muestras utilizadas de cada una de ellas.

Tabla 18. Especie animal, código asignado y número de muestras utilizadas.

Código	Especie animal	Número de muestras
1	Potro	5
2	Cerdo	1
3	Ternera	1
4	Pollo	1
5	Gallina	1
6	Pavo	1
7	Cordero	1
8	Conejo	1
9	Vaca	1
10	Toro	6

Según el resultado obtenido al realizar el análisis de componentes principales, con los cuatro primeros componentes se puede explicar el 92,72 % de la variabilidad de las muestras, aunque los que mayor peso tienen son los dos primeros componentes con un 60,22 % y un 22,12 %, respectivamente (Tabla 19).

Tabla 19. Porcentaje de variabilidad explicado por los cuatro primeros componentes principales.

Número de componente	% de variabilidad
1	60,22
2	22,12
3	5,43
4	4,95
Total	92,72

Ya que los dos primeros componentes principales explican el 82,34 % de la variabilidad, se decidió representar en una gráfica las puntuaciones de cada muestra para estos dos componentes. El resultado obtenido se muestra en la Figura 40.

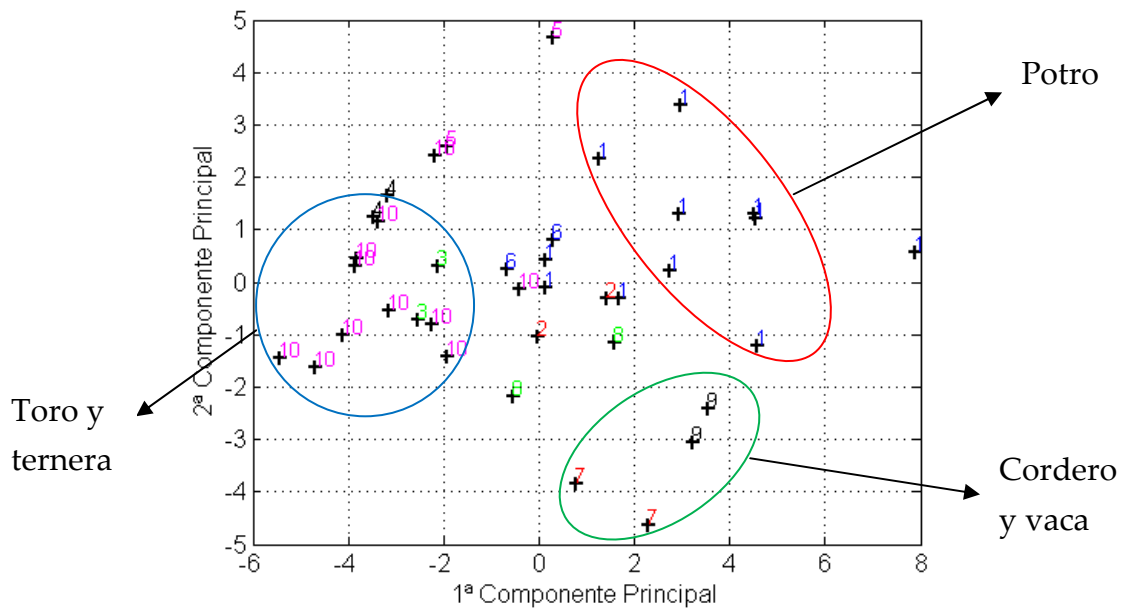


Figura 40. Representación de las puntuaciones de los dos primeros componentes principales para cada una de las muestras analizadas.

En esta gráfica, se observa la distribución de las muestras según los dos primeros componentes principales. Ambos componentes pueden ser positivos o negativos. El primer componente toma valores que varían entre 8 y -6. Las puntuaciones del segundo componente varían entre 5 y -5.

Como se puede observar no existe una agrupación clara de las muestras en función de las especies animales a las que pertenecen excepto cuando se trata de las repeticiones de una misma muestra. Sin embargo, sí que se pueden agrupar algunas de las muestras en tres zonas. La primera de ellas, corresponde con las muestras de potro. Estas muestras poseen un valor alto y de signo positivo tanto para el primer componente como para el segundo. La segunda de las zonas, corresponde con las muestras de cordero y vaca. Estas muestras poseen un valor positivo pero bajo en el primer componente principal y un valor bajo y negativo en el segundo de los componentes. En la tercera de las zonas se sitúan las muestras de toro y ternera. Ambas muestras tienen un valor bajo y negativo en el primer componente principal, siendo cercano a cero el valor del segundo de los componentes. El resto de muestras no se han podido asignar a ningún grupo.

Tras observar el gráfico, se ha llegado a la conclusión de que estas agrupaciones se han realizado según el contenido en lípidos de las muestras. Por ejemplo, el grupo formado por las muestras de cordero y vaca aglutina las dos muestras que poseen un mayor contenido lipídico, siendo del 11,6 % para la muestra de cordero y del 9,6 % para la muestra de carne de vaca. Por lo tanto, en este grupo se encuentran los animales más grasos. De igual forma, el grupo formado por las muestras de toro y ternera aglutinaría las muestras con un contenido intermedio en grasa, ya que este varía entre 1,9 % y 5,3 % en el caso del toro y es del 3,2 % en el caso de la ternera. La última de las zonas, agrupa las muestras de potro que poseen un contenido en lípidos inferior a las muestras de vaca y cordero pero superior a las de toro y ternera, ya que su porcentaje en grasa varía entre 3,4 % y 6,4 %.

Por lo tanto, a la vista de los resultados obtenidos, se podría concluir que mediante el Análisis de Componentes Principales (ACP) no ha sido posible la clasificación precisa de las muestras en función de la especie, aunque, sí que se ha realizado su agrupación en función de su contenido graso. De todas formas, se cree que es necesario seguir investigando en este ámbito e incrementar el número de muestras utilizadas para mejorar las estimaciones de los parámetros empleados en este análisis.

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. Se ha puesto a punto un método de análisis de muestras de carne basado en la espectroscopia FTIR-MIR obteniéndose espectros con bandas bien resueltas, sin saturar el detector y con ruido de línea base mínimo. Además, este método posee una elevada repetibilidad.
2. Los espectros de absorbancia de las diferentes especies presentan bandas de absorción que aparecen en números de onda similares pero variando la intensidad de absorción. Es decir, las muestras de carne poseen enlaces similares en los componentes básicos (proteína y grasa) pero varía la proporción en las que estos se encuentran en ellas.
3. Las bandas que aparecen aproximadamente en 3288 cm^{-1} , 1657 cm^{-1} y 1542 cm^{-1} se encuentran relacionadas entre sí y pueden atribuirse con modos de vibración de los grupos aminos de las proteínas. De igual forma, los picos presentes alrededor de 2925 cm^{-1} , 2854 cm^{-1} y 1746 cm^{-1} se encuentran relacionados entre sí y se asocian con la vibración de los enlaces característicos de los ácidos grasos.
4. El porcentaje de humedad y proteína de las muestras de carne de las diferentes especies apenas presentan variabilidad. Sin embargo, el contenido en lípidos, no solo varía entre especies sino también dentro de una misma especie debido a una serie de factores entre los que se encuentran el sexo, la edad de sacrificio, la alimentación o el sistema de producción empleado. Esta variabilidad es especialmente significativa en la carne de potro y de toro de lidia.
5. La espectroscopia FTIR-MIR permite la estimación del contenido graso de muestras de carne. Los resultados obtenidos son mejores cuando se emplean las intensidades de absorción a 2925 cm^{-1} que cuando se usan las de 1746 cm^{-1} . Las rectas de regresión obtenidas mediante espectroscopia FTIR-MIR para la estimación del contenido proteico de las muestras de carne no proporcionan resultados válidos.
6. El Análisis de Componentes Principales (ACP) hace posible la clasificación de las muestras de carne en función de su contenido en lípidos aunque no permite su clasificación por especies.

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. Alañón Moya, F.J.; Toribio Santos, E.; Ángeles Mejía, P.J.; Garcés Motiño, M. (2012). Producción Animal III. Avicultura. Producción de Pavo.
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. 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. 2005.
9. Babcock, S. M. A new method for the estimation of fat in milk especially adapted to creameries and cheese factories. University of Wisconsin, Agricultural Experiment Station, 24. 1890.
10. Baeza, E.; Chartrin, P.; Météau, K; Bordeau, T.; Juin, H.; Le Bihan-Duval, E.; Lessire, M.; Berri, C. (2010). Effect of sex and genotype on carcass composition and nutritional characteristics of chicken meat. *British Poultry Science*, 51, 344-353.
11. Bello, J. Jamón curado: Aspectos científicos y tecnológicos. Editorial Díaz de Santos. 2012.

12. Beriain, M.J.; Horcada, A.; Lizaso, G.; Insauti, K.; Purroy, A. (2011). Meat quality from fighting bulls in Spain. *Revista Científica de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Zulia*, 21, 88-95.
13. Bligh, E.G.; Dyer, W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal Biochemistry Physiology*, 37, 911-917.
14. Bolaños V., N.; Lutz C., G.; Herrera R., C.H. Química de Alimentos: Manual de laboratorio. Editorial Universidad de Costa Rica. 2003.
15. Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
16. 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.
17. Buxadé, C. Producciones cunícula y avícolas alternativas. (Capítulo 12. Pollos y huevos ecológicos. Escrito por García, E.). Zootecnia: Bases de producción animal. Volumen 10. Editorial Mundi-Prensa Libros. 1996.
18. Caballero, J.R. (2002). Producción de carne de toro de Lidia. *Mundo Ganadero*, 149, 18-21.
19. Cánovas, F.; García, R.; Jiménez, E.; Navarrete, E.; Pedraza, E. Seminarios sobre el toro de lidia. Editorial Universidad de Murcia. 1998.
20. Cañeque, V.; Sañudo, C. Metodología para el estudio de la calidad de la canal y de la carne en rumiantes. (Capítulo 5. Análisis químico de la carne. Escrito por: Oliván, M.; Mocha, M.; Martínez, M.J.; García, M.J.; Noval, G.; Osoro, K.) Monografías INIA: Ganadera Nº 1. Ministerio de Ciencia y Tecnología. 2000.
21. Carbonaro, M.; Nucara, A. (2010). Secondary structure of food proteins by Fourier transform spectroscopy in the mid-infrared region. *Amino Acids*, 38, 679-690.
22. Código Alimentario Español, 1967. (Decreto 2848/1967)
23. 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.

24. 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.
25. Devic, B.; Stamenkovic, T. (1989). Basic characteristics of the horse meat and the possibilities for its processing. *Tehnologija Mesa*, 30, 232-237.
26. Downey, G.; McElhinney, J.; Fearn, T. (2000). Species identification in selected raw homogenized meats by reflectance spectroscopy in the mid-infrared, near-infrared and visible ranges. *Applied Spectroscopy*, 54, 894-899.
27. Duckett, S. K.; Wagner, D. G.; Yates, L. D.; Dolezal, H. G.; May, S. G. (1993). Effects of time on feed on beef nutrient composition. *Journal of Animal Science*, 71, 2079-2088.
28. Dumas, J.B.A. (1831). Procédés de l'analyse organique. *Annales des Chimie et des Physique*, 2, 198-213.
29. Eichhorn, J.M.; Bailey, C.M.; Blomquist, G.J. (1985). Fatty acid composition of muscle and adipose tissue from crossbred bulls and steers. *Journal of Animal Science*, 61, 892-904.
30. 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.
31. 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.
32. 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.
33. 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.
34. FAIM II: Second Annual Conference on Carcass Evaluation, Meat Quality, Software and Traceability. Universidad de Kaposvár. Hungría. (29 y 30 de Octubre de 2013).
35. Fennema, O. R. Química de los alimentos. Editorial Acribia. 1993.

36. 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.
37. Fischer, K.; Linder, J.P.; Judas, M.; Höreth, R. (2006). Schlachtkörperzusamentsetzung und Gewbebeschaffenheit von schweren Schweinen. I. Mitteilung: Material und Methoden, Mastleistung, Schlachtkörperzusamentsetzung und Teilstückanteile. *Archive für Tierzucht Dummerstorf*, 49, 269-278.
38. Fischer, K.; Linder, J.P.; Judas, M.; Höreth, R. (2006). Schlachtkörperzusamentsetzung und Gewbebeschaffenheit von schweren Schweinen. II. Mitteilung: Merkmale der Fleisch und Fettqualität. *Archive für Tierzucht Dummerstorf*, 49, 279-292.
39. Flores, M.P.; Rodríguez, M. La alimentación del vacuno de carne. Nutrición Animal. Universidad de las Palmas de Gran Canaria. (Fecha de consulta: 26 de Agosto de 2013; Disponible en: <http://www.webs.ulpgc.es/nutranim/tema29.htm>).
40. 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.
41. Galián, M. (2007). Características de la canal y calidad de la carne, composición mineral y lipídica del cerdo Chato Murciano y su cruce con Ibérico. Efecto del sistema de manejo. (Tesis doctoral). Departamento de Tecnología de los Alimentos, Nutrición y Bromatología. Universidad de Murcia.
42. Gerber, N. (1981). Neuer Butyrometer. Patent CH2621, (1891-01-31), Bern: Eidgenössisches Institut für Geistiges Eigentum.
43. Gómez, M.D.; Pérez de Muniain, A.; Villanueva, M.; Asiain, F.J.; Maeztu, F.A.; Alonso, M.E.; Jordana, J.; Valera, M. (2010). Razas equinas en peligro de extinción: estudio morfológico. *Navarra Agraria*, Mayo-Junio, 41-48. ITG ganadero.
44. González, P; Caravaca, F. Producción de conejos de aptitud cárnica. Sistemas de Producción Animal. Universidad de Córdoba (Fecha de consulta: 24 de Agosto de 2013. Disponible en: http://www.uco.es/zootecniaygestion/img/pictorex/09_10_34_Cunicultura.pdf).

45. 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.
46. Hernández Gil, A. Tratado de nutrición. Composición y Calidad Nutritiva De Los Alimentos. Volumen 2. Editorial Panamericana. Madrid, España. 2010.
47. Hernández Rodríguez, M.; Sastre Gallego, A. Tratado de Nutrición. Ediciones Díaz de Santos. 1999.
48. 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.
49. Higson, S.P.J. Química analítica. Editorial McGraw-Hill. 2007.
50. <http://www.arpisa.com>
51. <http://www.fenapor-cercana.com>
52. <http://www.grupoan.com/esp/inicio.html>
53. Huff-Lonergan, E. Chemistry and Biochemistry of Meat (Chapter 28 of Handbook of Meat Processing, editado por Fidel Toldrá). Editorial John Wiley and Sons. 2010.
54. Hugo, A.; Roodt, E. (2007). Significance of porcine fat quality in meat technology: a review. *Food Reviews International*, 23, 175-198.
55. Hurst, W.J. Methods of Analysis for Functional Foods and Nutraceuticals. (Chapter 2. Analysis of Fatty Acids in Functional Foods with Emphasis on ω 3 Fatty Acids and Conjugated Linoleic Acid. Written by: Dobson, G.) Editorial CRC, Press. 2^o edición. 2008.
56. Introduction to FT-IR Spectroscopy. *Bruker*.
57. ISO 1444:1996. Meat and meat products. Determination of free fat content.
58. ISO 1735:2004. Cheese and processed cheese products. Determination of fat content. Gravimetric method (Reference method).
59. ISO 1737:2008. Evaporated milk and sweetened condensed milk. Determination of fat content. Gravimetric method (Reference method).
60. 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.

61. James, C.S. Analytical Chemistry of Foods. Editorial Blackie Academic and Professional. 1996.
62. Jeon, I.J.; Ikins, W.G. Analyzing Food for Nutrition Labeling and Hazardous Contaminants. (Chapter 7: Proteins and Amino Acids. Written by: Morr, C.V.; Ha, E.Y.W.) Editorial Dekker. 1995.
63. 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.
64. 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.
65. Kerry, J.; Kerry, J.; Ledward, D. Meat Processing: Improving Quality. (Chapter 5. Lipid-derived flavors in meat products. Written by: Shadidi, F.) Editorial Woodhead Publishing. Series in Food Science, Technology and Nutrition. Volumen 76. 2002.
66. Kjeldahl, J. (1883). Neue Methode zur Bestimmung des Stickstoffs in organischen Körpern. *Zeitschrift für Analytische Chemie*, 22, 366-382.
67. 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.
68. López de Torre, G.; Carballo, B. M. Manual de bioquímica y tecnología de la carne. Editorial A. Madrid Vicente. 1991.
69. Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275.
70. 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.
71. Mariey, L.; Signolle, J.P.; Travert, A.J. (2001). Discrimination, classification, identification of microorganisms using FTIR spectroscopy and chemometrics. *Vibrational Spectroscopy*, 26, 151-159.

72. 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.
73. 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.
74. Mojonier, T.; Troy, H.C. The technical control of dairy products: a treatise on the testing, analyzing, standardizing and the manufacture of dairy products. Mojonier Bros. Co. 1925.
75. 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.
76. Nürnberg, K.; Wegner, J.; Ender, K. (1998). Factors influencing fat composition in muscle and adipose tissue of farm animals. *Livestock Production Science*, 56, 145-156.
77. Orden APA/1413/2002, de 23 de mayo, por la que se ratifica el Reglamento de la Indicación Geográfica Protegida "Cordero de Navarra" o "Nafarroako Arkumea" y de su Consejo Regulador.
78. Orden Foral 36/2007, de 12 de febrero, del Consejero de Agricultura, Ganadería y Alimentación, por la que se regula el régimen general para la concesión, gestión y control de ayudas a la conservación y fomento de razas autóctonas en peligro de extinción. (B.O.N. nº 26, de 28 de febrero de 2007).
79. 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.
80. Peña, A. Bioquímica. Editorial Limusa. 1988.
81. Phillips, C.J.C. Principles of Cattle Production. Editorial CABI. 2010.
82. Picado, A.B.; Álvarez, M. Química I: introducción al estudio de la materia. Editorial Universidad Estatal a Distancia. 2008.
83. 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.

84. Pomianowski, J. F.; Rotkiewicz, W.; Borowski, J. (1994). Quality of selected culinary goods with addition of horsemeat. *Acta Academiae Agriculturae ac Technicae, Olstenensis Technologia Alimentorum*, 26, 63-70.
85. 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.
86. Reglamento (CE) nº 1183/2006 del Consejo, de 24 de julio de 2006, sobre el modelo comunitario de clasificación de las canales de vacuno pesado. Diario Oficial nº L 214 de 04/08/2006 p. 0001 – 0006.
87. Reglamento (CEE) Nº 2137/92 del consejo, de 23 de julio de 1992, relativo al modelo comunitario de clasificación de canales de ovino y se determina la calidad tipo comunitaria de las canales de ovino frescas o refrigeradas.
88. Reglamento (CEE) Nº 461/93 de la comisión, de 26 de febrero de 1993, por el que se establecen las disposiciones de aplicación del modelo comunitario de clasificación de canales de ovino.
89. Reglamento de la Indicación Geográfica Protegida "Ternera de Navarra o Nafarroako Aratxea" y su Consejo Regulador (aprobado por Orden Foral de 19 de junio de 2000, del Consejero de Agricultura, Ganadería y Alimentación). BON: nº 108, 6 de septiembre de 2000.
90. Reig, M.; Aristoy, M.C.; Toldrá, F. (2013). Variability in the contents of pork meat nutrients and how it may affect food composition databases. *Food Chemistry*, 140, 478-482.
91. Ripoché, A.; Guillard, A.S. (2001). Determination of fatty acid composition of pork fat by Fourier transform infrared spectroscopy. *Meat Science*, 58, 299-304.
92. Ritthausen, H; Pott, R. (1873). Untersuchungen über Verbindungen der Eiweisskörper mit Kupferoxyd. *Journal für Praktische Chemie/Chemiker-Zeitung*, 7, 361-373.
93. Roca, P.; Oliver, J.; Rodríguez, A.M. Bioquímica: Técnicas y métodos. Editorial Hélice. 2004.
94. Rohman, A.; Sismindari; 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.
95. Rohman, A.; Sunarminingsih, R; Che Man, Y.B. (2012). The Employment of FTIR Spectroscopy and Chemometrics for Classification and Quantification

- of Mutton Fat in Cod Liver Oil. *American Journal of Food Technology*, 7, 151-159.
96. 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.
97. 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.
98. Santa-Martina, J. (2001). El toro de lidia: conservación de los recursos genéticos. *Archivos de Zootecnia*, 50, 35-40.
99. Sarriés, M.V.; Beriain, M.J. (2005). Carcass characteristics and meat quality of male and female foals. *Meat Science*, 70, 141-152.
100. Sarriés, M.V.; Murray, B.E.; Troy, D.; Beriain, M.J. (2006). Intramuscular and subcutaneous lipid fatty acid profile composition in male and female foals. *Meat Science*, 72, 475-485.
101. Scibisz, I.; Reich, M.; Bureau, S.; Gouble, B.; Causse, M.; Bertrand, D.; Renard, C.M.G.C. (2011). Mid- Infrared spectroscopy as a tool for rapid determination of internal quality parameters in tomato. *Food Chemistry*, 125, 1390-1397.
102. Shen, F.; Ying, Y.; Li, B.; Zheng, Y.; Hu, J. (2011). Prediction of sugars and acids in Chinese rice wine by mid-infrared spectroscopy. *Food Research International*, 44, 1521-1527.
103. 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.
104. 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.
105. Smith, P.K.; Krohn, R. I.; Hermanson, G. T.; Mallia, A.K.; Gartner, F.H.; Provenzano, M.D.; Fujimoto, E.K.; Goeke, N.M.; Olson, B.J.; Klenk, D.C. (1985). Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid. *Analytical Biochemistry*, 150, 76-85.

106. Soxhlet, F. (1879). Die gewichtsanalytische Bestimmung des Milchfettes. *Dingler's Polytechnisches Journal*, 232, 461-465.
107. Sun, D-W. Infrared Spectroscopy for Food Quality Analysis and Control. Editorial Academic Press. 2009.
108. Szücs, E.; Nagy-Németh, A.; Vada-Kovacs, M.; Boda, I.; Csiba, A.; Acs, I.; Votsiky, E. (1987). Effect of genotype and age on meat quality parameters influencing palatability in several muscles (LD, PS, ST) of young fattening bulls. *World Review of Animal Production*, 23, 89–95.
109. 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.
110. Tewari, J.; Irudayaraj, J. (2004). Quantification of Saccharides in multiple floral honeys using Fourier transform infrared microattenuated total reflectance spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 3237-3243.
111. Verbeke, W.; Vackier, I. (2004). Profile and effects of consumer involvement in fresh meat. *Meat Science*, 67, 159-168.
112. 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.
113. Villanueva, M.; Pérez de Muniain, A.; Eguinoa, P. Razas Burguete y Jaca Navarra. (2009). Cebo de potros: lechales y quincenos. *Navarra Agraria*, Mayo-Junio, 41-44, ITG ganadero.
114. Voet, D.; G. Voet, J. Bioquímica. Editorial Médica Panamericana. 2006.
115. Warriss, P.D. Meat Science: An Introductory Text. Editorial CABI. 2010.
116. Willard, H.H.; Merritt Jr., L.L.; Dean, J.A.; Settle Jr., F.A. Instrumental Methods of Analysis (7th edition). Wadsworth Publishing Company. 1988.
117. 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.
118. Wu, D.; He, Y.; Shi, J., Shuijuan, F. (2009). Exploring Near and Mid-infrared Spectroscopy to Predict Trace Iron and Zinc Contents in Powdered Milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 1697-1704.

119. Yang, H.; Irudayaraj, J. (2001). Comparison of near-infrared, Fourier transform-infrared and Fourier transform-Raman methods for determining olive pomace oil adulteration in extra virgin olive oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 78, 889-895.
120. Yang, H.; Irudayaraj, J.; Paradkar, M.M. (2005). Discriminant analysis of edible oils and fats by FTIR, FT-NIR and FT-Raman spectroscopy. *Food Chemistry*, 93, 25-32.