

Universidad de Córdoba

Departamento de Producción Animal

Control no destructivo e *in situ* de
productos y procesos en la industria del
cerdo ibérico usando sensores espectrales
de infrarrojo cercano

Tesis doctoral realizada por

Eduardo Zamora Rojas



TITULO: *Control no destructivo e in situ de productos y procesos en la industria del cerdo ibérico usando sensores espectrales de infrarrojo cercano*

AUTOR: *EDUARDO ZAMORA ROJAS*

© Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba.
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

www.uco.es/publicaciones
publicaciones@uco.es



**Control No Destructivo e *In Situ* de
Productos y Procesos en la Industria del
Cerdo Ibérico Usando Sensores
Espectrales de Infrarrojo Cercano**

Tesis doctoral presentada por
Eduardo Zamora Rojas
para aspirar al grado de Doctor por la
Universidad de Córdoba

dirigida por las doctoras:
Ana Garrido Varo (Catedrática Universidad)
Dolores Pérez Marín (Profesora Titular de Universidad)

Ingeniería de Sistemas de Producción Agroganaderos

Acceso al repositorio virtual de esta tesis doctoral:

http://bit.ly/repositorio_tesis_EZR



Tesis doctoral: Control No Destructivo e *In Situ* de Productos y Procesos en la Industria del Cerdo Ibérico Usando Sensores Espectrales de Infrarrojo Cercano 2013, Eduardo Zamora Rojas, e.zamora@uco.es

Imágenes de la portada y separadores realizadas por cavemanboon (galería flickr)

Universidad de Córdoba, Córdoba, España



Dra. ANA GARRIDO VARO, Catedrática de Universidad del Departamento de Producción Animal de la Universidad de Córdoba, y Dra. DOLORES PÉREZ MARÍN, Profesora Titular del Departamento de Producción Animal de la Universidad de Córdoba

INFORMAN: que la presente tesis doctoral titulada “*Control no destructivo e in situ de productos y procesos en la industria del cerdo ibérico usando sensores espectrales de infrarrojo cercano*”, y que constituye la memoria presentada por D. *Eduardo Zamora Rojas*, ha sido realizada bajo nuestra dirección durante el periodo 2009-2013 y, a nuestro parecer, reúne las condiciones académicas exigidas por la legislación vigente para aspirar al grado de Doctor por la Universidad de Córdoba.

y para que quede constancia, firmamos el presente informe en Córdoba a 18 de marzo de 2013.



Fdo.: Prof^a. Dra. Ana Garrido Varo



Fdo.: Prof^a. Dra. Dolores Pérez Marín



TÍTULO DE LA TESIS:

Control no destructivo e *in situ* de producto y procesos en la industria del cerdo ibérico usando sensores espectrales de infrarrojo cercano

DOCTORANDO: D. Eduardo Zamora Rojas

INFORME RAZONADO DE LAS DIRECTORAS DE LA TESIS

La presente tesis doctoral conforma un importante avance en el conocimiento relativo a la implantación de sensores espectrales de infrarrojo cercano en el control de calidad *in situ* y no destructivo en la industria del cerdo ibérico. La investigación básica y aplicada realizada confluye en la obtención de resultados de indudable relevancia científica y tecnológica.

Los trabajos de investigación de carácter aplicado contemplan una aportación metodológica para controlar, supervisar, actualizar y recalibrar modelos predictivos cuantitativos NIRS robustos en productos derivados del cerdo ibérico, con una importante reducción en el coste analítico. Asimismo, evalúan con rigor científico un espectrofotómetro NIRS, basado en tecnología de sistemas micro-electro-mecánico (MEMS), para el control de calidad de canales, tanto cuantitativo (predicción de la composición de los cuatro ácidos grasos principales del tejido adiposo subcutáneo) como cualitativo (clasificación en función del régimen alimenticio de los animales durante los dos meses previos al sacrificio), *in situ* en la línea de faenado. Una aportación también de relevancia para la industria ha sido la puesta a punto de una metodología para la transferencia de bases de datos espectrales desde equipos con altas prestaciones científico-técnicas a equipos portátiles con un diferente diseño óptico. De esta forma, es posible transferir librerías existentes en instrumentos de altas prestaciones sin que los modelos de calibración tengan una pérdida elevada de precisión, exactitud y robustez.

El uso de tecnologías de la información y de la comunicación con el desarrollo de rutinas de programación específicas para el tratamiento de datos espectrales ha demostrado el potencial de esta tecnología para el diseño de plataformas de apoyo a la toma de decisiones para el control de calidad *in situ* y no destructivo en la industria de transformación cárnica.

El autor de esta tesis doctoral, financiado por el Ministerio de Educación, Cultura y Deporte dentro del programa de “Formación del Profesorado Universitario”, ha completado parte de su formación para dar respuesta a los objetivos planteados en su plan de investigación en dos centros universitarios de reconocido prestigio internacional como son la Universidad de Electro-Comunicaciones de Tokio, Japón (4 meses), bajo la supervisión del Prof. Yukio Yamada, y la Universidad Católica de Lovaina, Bélgica (3 meses), bajo la supervisión del Prof. Wouter Saeys. En ellos, se ha formado en técnicas espectrales para la caracterización óptica de tejidos biológicos y métodos de

simulación para entender como interacciona la radiación NIR con estos materiales. Estos trabajos de caracterización y simulación constituyen un importante avance científico en el conocimiento de la propagación de la radiación NIR a través de la piel, aspecto fundamental para entender la pérdida de capacidad predictiva de los modelos desarrollados con productos intactos o en medidas sobre la piel frente a otros modos de análisis o qué factores de diseño instrumental o de tratamiento de datos espectrales se pueden incorporar, mejorar y/o adaptar para conseguir aplicaciones precisas y robustas.

Los ensayos que constituyen esta tesis doctoral han dado lugar a distintas publicaciones. Tres artículos han sido publicados en revistas internacionales con un alto impacto en sus respectivas áreas científicas. Los otros están en proceso de evaluación para su posible publicación. A continuación, se detallan dichos artículos y ensayos:

- Monitoring NIRS calibrations for use in routine meat analysis as part of iberian pig-breeding programs, *Food Chemistry*, 2011, **129**, 1889-1897.
- *In-situ* iberian pig carcass classification using a micro-electro-mechanical system (MEMS)-based near infrared (NIR) spectrometer, *Meat Science*, 2012, **90**, 636-642.
- Prediction of fatty acid content in pig adipose tissues by near infrared spectroscopy: at-line versus *in-situ* analysis (enviado), *Meat Science*.
- Handheld NIRS analysis for routine meat quality control: database transfer from at-line instruments, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 2012, **114**, 30-35.
- Double integrating spheres measurements for estimating optical properties of pig subcutaneous adipose tissue (enviado), *Food and Bioprocess Technology*.
- Characterization of diffuse reflectance near-infrared spectroscopy for non-invasive pig skin measurements (enviado), *Food and Bioprocess Technology*.
- Optical properties of pig skin epidermis and dermis estimated with double integrating spheres measurements (enviado), *Innovative Food Science and Emerging Technologies*.

Además, muchos de los resultados alcanzados se han divulgado a través de dieciséis contribuciones en congresos internacionales y nacionales, en un capítulo de revisión sobre la aplicación de la tecnología NIRS en el sector agroalimentario y en la colaboración de un artículo científico que evalúa el potencial de la tecnología NIRS para la estima del índice de reposición en montanera.

Se ha de destacar que el autor de esta tesis doctoral, además de completar con éxito su programa de formación investigadora, se ha formado como docente universitario a través del curso de experto para la formación del profesorado universitario de la Universidad de Córdoba. De hecho, ha impartido docencia reglada en la titulación de Ingeniero Agrónomo y ha estado involucrado en diferentes proyectos de innovación docente, especialmente en el proyecto “Diseño y evaluación de una plataforma internacional moodle para la innovación en la enseñanza y el aprendizaje de tecnología NIRS”.

Por todo lo anterior, pensamos que esta tesis doctoral reúne suficiente requisitos para ser sometida a su defensa pública.

Córdoba, 18 de marzo de 2013

VºBº las directoras



Fdo.: Profª. Dra. Ana Garrido Varo



Fdo.: Profª. Dra. Dolores Pérez Marín

Prefacio

Esta memoria presenta el conjunto de trabajos realizados en esta tesis doctoral para cumplir con parte de los requisitos necesarios para la obtención del título de Doctor con Mención Internacional en la Universidad de Córdoba. El trabajo experimental está compuesto por un compendio de artículos científicos financiados por diferentes proyectos y contratos de I+D+i del grupo de investigación “Ingeniería de Sistemas de Producción Agroganaderos” (AGR 128)¹. El autor de este trabajo ha sido asimismo beneficiario de una beca del Ministerio de Educación dentro del programa de “Formación del Profesorado Universitario” (FPU) (AP2008-00838), con la que ha podido disfrutar de distintas ayudas para realizar estancias de formación en la Universidad de Electro-Comunicaciones de Tokio, Japón (4 meses), bajo la supervisión del Prof. Yukio Yamada y en la Universidad Católica de Lovaina, Bélgica (3 meses), bajo la supervisión del Prof. Wouter Saeyns.

Mis agradecimientos para todos aquellos que de un modo u otro han influido durante esta etapa de formación y que, con toda seguridad, perdurarán en el tiempo. Durante estos años, he recorrido parte del mundo aprendiendo de otros y sumergiéndome en otras culturas gracias a mis supervisores “oficiales” y a otros que, aunque no figuren en los papeles, también han sido igual de importantes. Ellos me han proporcionado el apoyo, libertad y asesoramiento adecuado, tanto profesional como personal, para culminar este proyecto. Además, he de dar las gracias al Ministerio de Educación español, al International Council of Near Infrared Spectroscopy (ICNIRS) y al Council for Near Infrared Spectroscopy (CNIRS) por colaborar en la financiación que me ha permitido asistir a diferentes conferencias (NIR2009, IDRC2010 y NIR2011), organizadas durante esta etapa de formación, y conocer los últimos avances en esta tecnología, así como darme la oportunidad de disfrutar de la gran comunidad/familia NIRS. Esta tesis doctoral tampoco hubiera sido posible sin la colaboración de empresas del sector del cerdo ibérico (COVAP S.C.A., D.O. Los Pedroches, Ibéricos de Bellota S.A., Embutidos Camilo Rios S.L. y Sierra de Sevilla S.L.).

¹ Proyecto de Excelencia de la Junta de Andalucía: “Seguridad y trazabilidad en la cadena alimentaria usando NIRS” (P09-AGR-5129).

Proyecto de investigación del INIA: “Evaluación de la espectroscopía en el infrarrojo cercano (NIRS) para determinar el régimen alimenticio de cerdos ibéricos” (RTA 2008-00026-007-02).

Proyecto FEDER: Optimización de la evaluación genética de cerdo Ibéricos con inclusión de parámetros de calidad en la materia prima y en los productos elaborados (1FD1997-1252-CO02-02).

Proyecto CICYT-Feder IFD1997-0990.

Mi “casa” durante ocho años, el grupo de investigación “Ingeniería de Sistemas de Producción Agroganaderos”, ha sido un espacio de alegrías, sorpresas, duros momentos y de aprendizaje personal y profesional junto a gente excepcional. Mil gracias a todos ellos. Para el recuerdo van a quedar las jornadas madrugadoras de campo y matanza, interminables en el despacho o nocturnas en la ciudad.

A todos los que han sido mi apoyo durante estos años, desde mi llegada a Córdoba como durante mis estancias en el extranjero, gracias por ayudarme a vivir momentos inolvidables.

A mi familia que con su cariño, apoyo, esfuerzo y confianza me han permitido disfrutar de la vida, brindarme muchas oportunidades y alcanzar grandes desafíos.

Eduardo Zamora Rojas

Córdoba, 18 de marzo 2013



Índice

Prefacio	13
Resumen	17
Summary.....	21
Índice de tablas	25
Índice de figuras	29
Lista de abreviaturas y símbolos más frecuentes.	33
1. Introducción.....	41
2. Objetivos.....	47
3. Revisión bibliográfica	51
3.1. Escenario productivo-económico del sector del cerdo ibérico	53
3.2. Métodos analíticos utilizados en el control de calidad de productos de cerdo ibérico.....	71
3.2.1. Métodos analíticos tradicionales.....	73
3.2.2. Métodos analíticos no tradicionales.....	76
3.3. Espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano.	101
3.3.1. Fundamentos teóricos de la espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano.....	101
3.3.2. Instrumentación NIRS de vanguardia.....	107
3.3.3. Interacción entre radiación NIR y tejidos biológicos	120
3.3.4. Análisis multivariante de datos NIRS.....	138
3.3.5. La espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano en el control de calidad de productos cárnicos.....	160
4. Materiales y métodos experimentales generales	177
5. Estudios y publicaciones	189
5.1. Control y actualización de modelos de calibración NIRS para productos procedentes de cerdo ibérico.....	193
5.1.1. Monitoring NIRS calibrations for use in routine meat analysis as part of iberian pig-breeding programs.....	197
5.1.2. Control y recalibración de modelos NIRS para la predicción de ácidos grasos en muestras de grasa subcutánea fundida de cerdo ibérico	209
5.1.3. Control y recalibración de modelos NIRS para la predicción de ácidos grasos en muestras de tejido adiposo subcutáneo intacto de cerdo ibérico	219

5.2. Optimización de parámetros instrumentales y protocolo para el análisis espectral de productos cárnicos con equipos MEMS-NIRS portátiles.....	227
5.3. Control de calidad cualitativo y cuantitativo de canales de cerdo ibérico <i>in situ</i> en la línea de faenado.....	237
5.3.1. <i>In-situ</i> iberian pig carcass classification using a micro-electro-mechanical system (MEMS)-based near infrared (NIR) spectrometer.....	241
5.3.2. Evaluación de distintos algoritmos cualitativos para la clasificación <i>in situ</i> de canales de cerdo ibéricos en función de su régimen alimenticio	251
5.3.3. Prediction of fatty acids content in pig adipose tissues by near infrared spectroscopy: at-line versus <i>in-situ</i> analysis.....	259
5.4. Transferencia de modelos de calibración NIRS desarrollados en laboratorio a instrumentos portátiles MEMS-NIRS.....	287
5.4.1. Handheld NIRS analysis for routine meat quality control: database transfer from at-line instruments.....	291
5.5. Caracterización óptica y simulación de la propagación de la radiación NIR en tejido cutáneo y adiposo porcino	299
5.5.1. Double integrating spheres measurements for estimating optical properties of pig subcutaneous adipose tissue	303
5.5.2. Optical properties of pig skin epidermis and dermis estimated with double integrating spheres measurements.....	323
5.5.3. Characterization of diffuse reflectance near-infrared spectroscopy for non-invasive pig skin measurements.....	341
5.6. Diseño de plataformas de apoyo a la toma de decisiones en la industria del cerdo ibérico basadas en la tecnología NIRS	359
6. Reflexiones generales y recomendaciones para trabajos futuros de I+D+i.....	367
7. Conclusiones - Conclusions.....	377
8. Bibliografía	389
9. Otras aportaciones científicas	421
9.1. Comunicaciones en congresos	423
9.2. Trabajos bibliográficos y otras publicaciones.....	483
9.3. Manuales y guías prácticas.....	485

Resumen

En esta tesis doctoral, se presentan distintos estudios en los que se ha diseñado, desarrollado, evaluado y optimizado el uso de la tecnología NIRS como sistema de control *in situ* de procesos y productos y de apoyo a la toma de decisiones en la industria de transformación del sector del cerdo ibérico. El trabajo abarca desde aspectos científicos-técnicos, orientados a las necesidades de la industria y relacionados con la implantación *in situ* de sensores NIRS portátiles en el control de calidad de productos derivados del cerdo ibérico, como aspectos de investigación básica, relacionados con la propagación de la radiación NIR a través de tejido porcino.

Este documento consta de nueve capítulos. El primero de ellos proporciona una introducción y define el marco en el que se desarrolla toda la tesis doctoral. El segundo fija los objetivos a alcanzar. En el tercer capítulo, se recoge una revisión bibliográfica sobre la realidad actual del sector productivo del cerdo ibérico, las últimas investigaciones en el control de calidad de productos derivados de este animal, así como el estado del arte de la tecnología NIRS. El siguiente capítulo describe, de forma general, los materiales y métodos utilizados en los distintos apartados de esta tesis doctoral. El quinto capítulo contiene los resultados generados en esta tesis doctoral, tanto los publicados o enviados a revistas internacionales como los estudios independientes de cada uno de los apartados que constituyen esta sección. Posteriormente, se realiza una reflexión general de todo el trabajo para dar una visión unificada del mismo, asimismo se proporciona algunas recomendaciones y perspectivas para futuros trabajos de investigación, desarrollo e innovación (I+D+i) en la implantación de la tecnología NIRS en el sector del cerdo ibérico. En el séptimo capítulo, se recogen las conclusiones de esta tesis doctoral. El octavo capítulo contiene todas las citas bibliográficas de este documento. Finalmente, en el noveno apartado se agrupan distintas publicaciones presentadas en congresos internacionales y nacionales, así como otros trabajos bibliográficos publicados en revistas internacionales. Además, se incluye un manual sobre el procesamiento de datos procedentes de equipos portátiles MEMS-NIRS, como el evaluado en esta tesis doctoral, así como una guía práctica para el uso y calibración de sistemas de doubles esferas integradoras que se espera que sea de utilidad para futuros investigadores o técnicos en este área.

En referencia a las publicaciones, el *Artículo 1* (sección 5.1.1) realiza una aportación metodológica para el desarrollo, validación, control y recalibración de modelos NIRS cuantitativos de carne picada de cerdo ibérico. La metodología descrita en este apartado permite, con un coste económico reducido, actualizar modelos NIRS cuantitativos para obtener predicciones fiables en rutina a lo largo del tiempo. Esta misma metodología fue,

posteriormente, aplicada al análisis de los principales productos de cerdo ibérico utilizados tradicionalmente en el control de calidad, grasa fundida y tejido adiposo intacto (sección 5.1.2 y 5.1.3, respectivamente). En estos dos estudios, se desarrollan y evalúan el mantenimiento y actualización de modelos cuantitativos NIRS para estimar los cuatro ácidos grasos principales del perfil lipídico de cerdo ibérico. En el *Artículo 4* (sección 5.4.1), se evalúan distintos algoritmos de estandarización para transferir, a equipos portátiles NIRS basados en tecnología de sistemas micro-electro-mecánicos (MEMS), bases de datos espectrales desarrolladas en equipos monocromadores de altas prestaciones científico-técnicas. De esta forma, se pone en valor todo el trabajo realizado durante años en laboratorio cuando se quiere iniciar una nueva andadura en el análisis *in situ* con equipos portátiles. En este estudio, la metodología de transferencia es aplicada a un estudio de caso centrado en la carne picada de cerdo ibérico. El *Artículo 2* (sección 5.3.1) recoge la evaluación del mismo equipo portátil MEMS-NIRS, trabajando en la línea de faenado, para la clasificación de canales de cerdo ibérico en distintas categorías comerciales. Estos resultados son comparados con otros obtenidos en equipos NIRS de laboratorio y con distintas formas de presentación de muestra. Dada la variedad de algoritmos cualitativos que existe en la literatura científica y la necesidad de desarrollar programas propios de análisis de datos espectrales para este tipo de instrumentos portátiles, en la sección 5.3.2, se comparan distintos algoritmos cualitativos de código libre para la clasificación de canales de cerdo ibérico. El *Artículo 3* (sección 5.3.3) evalúa el potencial de equipos portátiles MEMS-NIRS para estimar la composición de los cuatro ácidos grasos principales en canales de cerdos ibéricos analizadas *in situ* en la línea de faenado. Dichos modelos cuantitativos fueron comparados con otros desarrollados en monocromadores de laboratorio con los mismos colectivos de muestras. Además, en dicha publicación se estima y compara el error total, es decir, la contribución del error del método de análisis junto con el error de muestreo, para el análisis de cuatro ácidos grasos (oleico, linoleico, palmítico y esteárico) por cromatografía gases y análisis NIRS de grasa fundida, intacta y de canales de cerdo ibérico en base a las posibilidades de muestreo que permite cada técnica. Asimismo, este estudio incluye un análisis exploratorio de las principales bandas de absorción con importancia en el desarrollo de modelos cuantitativos NIRS para la predicción de estos ácidos grasos. Estos estudios de investigación aplicada se complementan, en esta tesis doctoral, con otros de investigación básica relacionados con el estudio de la interacción de la radiación NIR en el tejido porcino. Estos trabajos parten con el objetivo de asentar las bases para dar respuesta a algunos interrogantes científicos que han surgido en los últimos años. Concretamente, estos estudios surgen tras observar que los modelos desarrollados en tejidos intactos, ya sean en laboratorio o *in situ* en la línea de faenado, mostraron una pérdida de capacidad predictiva frente a modelos obtenidos para muestras de grasa fundida de cerdo. Además, el interés científico por el análisis *in vivo* y no

invasivo de animales en el campo han precursado la realización de estos estudios. El *Artículo 5* (sección 5.5.1) estudia y caracteriza las propiedades ópticas del tejido adiposo subcutáneo procedente de cerdo ibérico, mientras el *Artículo 6* (sección 5.5.2) detalla y discute los resultados obtenidos en el caso del tejido cutáneo porcino (epidermis y dermis). Estos estudios son imprescindibles para establecer las bases del conocimiento en el que asentar los futuros avances instrumentales y de tratamiento de datos en el terreno del análisis no destructivo e *in situ* de animales en el campo o canales en el matadero. De hecho, el *Artículo 7* (sección 5.5.3) recoge datos experimentales y simulados matemáticamente referidos a la profundidad que alcanza la radiación NIR en tejido cutáneo y subcutáneo porcino en función de la distancia entre la fuente de luz y el detector.

Todos los estudios de esta tesis doctoral, tanto de investigación aplicada como básica, confluyen en el avance de la tecnología NIRS como herramienta objetiva, fiable, precisa y económicamente eficiente para el control no destructivo e *in situ* de productos y procesos en la industria del cerdo ibérico. De hecho, en la sección 5.6, se diseña una plataforma de apoyo a la toma de decisiones en la industria de transformación del cerdo ibérico, basada en el análisis NIRS *in situ* con equipos portátiles MEMS-NIRS, para el control de distintos parámetros de calidad dando una imagen conjunta y realista de todo el trabajo para su posible implementación en el sector cárnico.

Summary

This thesis presents several studies in which NIRS technology has been developed, applied, evaluated and validated as an *in-situ* process and product control system in the iberian pig industry. The work ranges from scientifically-technical aspects oriented to the industry and related to the implementation of *in-situ* handheld NIRS sensors for the quality control of iberian pig products and basic research studies related to the NIR radiation propagation through porcine tissues.

This document consists of nine chapters. The first one provides an introduction and framework in which the present PhD thesis is developed. The second chapter describes the objectives achieved in this thesis. The third chapter provides a literature review of the current iberian pig production sector, the latest advances in the quality control of iberian pig products, as the state of art of the NIRS technology. The next chapter describes, generally, the materials and methods used in the different sections of this thesis. The fifth chapter contains the results generated in this PhD thesis which have been published or submitted to international journals or written in independent studies in each of the parts of this section. Subsequently, general considerations of the all work are done to provide a general view of the results, also it provides some recommendations and perspectives for future research, development and innovation in the implementation of NIRS technology in the Iberian pig sector. The seventh chapter contains the conclusions, providing a perspective on the future implementation of this technology in the iberian pig sector. The eighth contains all citations of this document. The last chapter, as an annex, comprises the several publications done in national and international conferences, as other reviewed published papers together with two manual: one for data processing of MEMS-NIRS spectral information and other related with the calibration procedure of double integrating spheres systems, which is expected to be useful for future researchers and technicians in this area.

Concerning the published papers, *Paper 1* (section 5.1.1) describes a methodology for the development, validation, monitoring and recalibration of quantitative NIRS models for routine control of ground iberian pork meat. The methodology described in this section enables, with a reduced economical cost, the update of NIRS models to obtain suitable prediction in routine over time. The same methodology was, later on, applied for the analysis of the main IP products traditionally used in the quality control, melted fat and intact adipose tissue (section 5.1.2 and 5.1.3, respectively). In these two studies, the monitoring and recalibration of quantitative NIRS models for estimating the main fatty acids of the lipid profile of IP animals is developed and evaluated.

In *Paper 4* (section 5.4.1) is evaluated several standardization algorithms for cloning handheld NIRS instruments based on micro-electro-mechanical systems (MEMS) with high-performance monochromators. Thus, the samples analyzed during years in the laboratory are preserved when new portable instruments want to be used for *in-situ* applications. In this study, the methodology for transferring data bases between those instruments was applied to ground meat samples. *Paper 2* (section 5.3.1) evaluates the same MEMS-NIRS instrument, working in the carcass process line, for qualitative analysis of iberian pig carcasses in different commercial categories. These results are compared with other obtained in at-line NIRS instruments with different analysis modes. Due to the variety of qualitative algorithms and the requirements for development purpose-designed software, in section 5.3.2, it is evaluated different classification algorithms for determining the feeding regime of iberian pigs analyzed with a MEMS-NIRS spectrometer. *Paper 3* (section 5.3.2) describes the development of quantitative models for the prediction of main fatty acids in iberian pig carcasses analyzed *in-situ* in the carcass process line with a handheld MEMS-NIRS device. These models were compared with other obtained with at-line instruments and with different sample analysis modes. Moreover, in this study is estimated and compared the total errors, as a contribution of the measurement error and sampling error, for four fatty acids (oleic, linoleic, palmitic and stearic) based on gas chromatography analysis and NIRS predictions for melted fat, intact adipose tissue and IP carcasses analysis. Also, this study includes an exploratory analysis for the major absorption bands involved in the model development. These research applied studies are complemented, in this thesis, with other basic research works related to the study of the interaction of the NIR radiation in the porcine tissue. These works have the goal to address some scientific questions that have arisen in recent years. Specifically, these studies appear after observing that the models developed in intact tissues, at the laboratory or *in-situ*, showed a loss of predictive performance in comparison to predictive models obtained for melted fat samples. Furthermore, the scientific interest in noninvasive and *in vivo* animal analysis in the field has motivated these studies. *Paper 5* (section 5.5.1) studies and characterizes the bulk optical properties of subcutaneous fat from iberian pigs, while *Paper 6* (section 5.5.2) describes and discusses the results obtained in the case of pig skin tissue (epidermis and dermis). These studies are essential to establish the knowledge in which to base the future advances related to the non-destructive and *in-situ* analysis of animals in the field and carcasses in the slaughterhouse. In fact, *Paper 7* (section 5.5.3) reports experimental and mathematically simulated data related to the NIR radiation propagation depth as a function of the light-detector distance in pig skin and subcutaneous tissue, necessary to advance in the instrument design and/or mathematical strategies that enable understanding and optimization of the non destructive and non invasive analysis.

All studies in this PhD thesis, both applied and basic research, converge in the advancement of the NIRS technology as objective, reliable, accurate and cost-effective tool for the non-destructive and *in-situ* quality control of products and processes in the pig industry. In fact, in section 5.6, a decision-making support platform in the iberian meat processing industry based on *in-situ* NIRS analysis with portable MEMS-NIRS devices was designed to control various quality parameters, giving a full and realistic image of all the work for its possible implementation in the meat sector.

Índice de tablas

Tabla 1.1. Evolución del censo de animales registrados en RIBER entre 2008 y 2011	56
Tabla 1.2. Aspectos regulados por la Norma de Calidad (BOE, 2007a) para cada categoría comercial CI según régimen alimenticio	59
Tabla 1.3. Principales propuestas realizadas por distintos actores del sector del cerdo ibérico para modificar la Norma de Calidad (BOE, 2007a).	62
Tabla 2.1. Estudios realizados en base al comportamiento graso de muestras de cerdo ibérico según régimen alimenticio.....	74
Tabla 2.2. Clasificación de productos de cerdo ibérico en distintas categorías comerciales en base al análisis cromatográfico de distintos componentes	82
Tabla 2.3. Equipos de nariz electrónica para determinar la categoría comercial de productos de cerdo ibérico.	85
Tabla 2.4. Medidas de ultrasonidos para autentificar muestras de cerdo ibérico por régimen alimenticio.....	88
Tabla 2.5. Discriminación de categorías ibéricas según régimen alimenticio por análisis de isótopos estables.	90
Tabla 2.6. Investigaciones realizadas con técnicas de imagen para autentificar productos de cerdo ibérico según régimen alimenticio	92
Tabla 2.7. Espectroscopía de movilidad de iones como técnica de clasificación de productos de cerdo ibérico según régimen alimenticio	92
Tabla 2.8. Características de las distintas técnicas analíticas aplicadas a la caracterización y clasificación de productos de cerdo ibérico según régimen alimenticio	95
Tabla 3.1. Investigaciones sobre espectroscopía del infrarrojo cercano (NIRS) para predecir cuantitativamente el perfil de ácidos grasos en grasas y carnes de cerdo ibérico	167
Tabla 3.2. Investigaciones basadas en espectroscopía del infrarrojo cercano (NIRS) para clasificar productos derivados del cerdo ibérico según régimen alimenticio	171
Tabla 3.3. Investigaciones sobre control de calidad en productos cárnicos derivados del cerdo ibérico basadas en espectroscopía del infrarrojo cercano (NIRS).	174
Tabla 4.1. Colectivos de muestras utilizados en los distintos estudios referentes a la implantación <i>in situ</i> de la tecnología NIRS en la industria de transformación del cerdo ibérico.	180

Tabla 4.2. Principales características de los instrumentos utilizados.	184
Tabla 4.3. Colectivos de muestras empleados en los estudios de caracterización óptica del tejido cutáneo y subcutáneo porcino	185
Tabla 5.1.2.1. Número de muestras de grasa fundidas analizadas en FNS por año.....	211
Tabla 5.1.2.2. Estadísticos descriptivos de las características del colectivo de calibración y validación	213
Tabla 5.1.2.3. Modelos de calibración para la predicción cuantitativa del perfil de ácidos grasos de muestras de grasa fundida.	215
Tabla 5.1.2.4. Estadísticos descriptivos de las características del colectivo de calibración y validación una vez seleccionadas las 20 muestras para recalibración.....	215
Tabla 5.1.2.5. Modelos de calibración actualizados para la predicción cuantitativa del perfil de ácidos grasos de muestras de grasa fundida.....	216
Tabla 5.1.3.1. Número de muestras de grasa subcutánea intacta analizadas en FNS por año	221
Tabla 5.1.3.2. Estadísticos descriptivos de las características del colectivo de calibración y validación	222
Tabla 5.1.3.3. Modelos de calibración para la predicción cuantitativa del perfil de ácidos grasos de muestras de grasa intacta.....	223
Tabla 5.1.3.4. Estadísticos descriptivos de las características del colectivo de calibración y validación una vez seleccionadas las muestras para recalibrar.	223
Tabla 5.1.3.5. Modelos de calibración actualizados para la predicción cuantitativa del perfil de ácidos grasos de muestras de grasa intacta.	224
Tabla 5.2.1. Parámetros del test de validación del funcionamiento (PQ) con los límites establecidos por el fabricante y los valores de los equipos MEMS-NIRS Phazir TM y MicroPhazir TM	231
Tabla 5.2.2. Tiempo de medidas para distintos equipos NIRS de laboratorio y portátiles	234
Tabla 5.3.2.1. Distribución del número de canales analizadas <i>in situ</i> con un equipo MEMS-NIRS portátil según régimen alimenticio y campaña de sacrificio.....	254
Tabla 5.3.2.2. Resultados de clasificación, según régimen alimenticio, obtenidos con distintos algoritmos multivariantes para el análisis <i>in situ</i> de tejido adiposo subcutáneo en la canal de cerdo ibérico	256
Tabla 5.3.2.3. Resultados de clasificación, según régimen alimenticio y considerando sólo “bellota” y “cebo”, obtenidos con distintos algoritmos	

multivariantes para el análisis <i>in situ</i> de tejido adiposo subcutáneo en la canal de cerdo ibérico	257
Tabla 6.1. Costes estimados de realizar un análisis NIRS de muestras de grasa de cerdo ibérico con instrumentos de laboratorio y portátiles.	371

Índice de figuras

Figura 1.1. Número de animales sacrificados bajo Norma de Calidad según régimen alimenticio en las campañas 2009/2010 y 2010/2011	57
Figura 1.2. Precios medios alcanzados en la lonja de ganado de Salamanca en la campaña 2011/2012 para los distintos regímenes alimenticios.....	58
Figura 1.3. Número de mataderos vinculados al sector porcino ibérico por comunidades autónomas.....	64
Figura 1.4. Denominaciones de origen protegidas españolas de productos de cerdo ibérico	64
Figura 1.5. Número de piezas comercializadas de distinto régimen alimenticio bajo Norma de Calidad en 2011.	65
Figura 1.6. Volumen consumido (línea sólida) y valor alcanzado en el mercado (línea punteada) de productos derivados del CI derivados en el Canal Hogares durante 2008-2011	66
Figura 1.7. Precio medio de distintos productos de porcino ibérico durante 2008-2011 en el Canal Hogares.....	67
Figure 1.8. Precios medios alcanzados en el último año en la lonja de ganado de Salamanca para productos no procesados y de productos curados en “El Corte Inglés”* en noviembre 2012.	68
Figura 3.1. Regiones del espectro electromagnético.	101
Figura 3.2. Fenómenos de interacción entre la radiación electromagnética y la materia	102
Figura 3.3. Representación gráfica de un espectro electromagnético en el infrarrojo cercano	103
Figura 3.4. Esquema que representa los distintos modos de análisis NIRS. A) Reflectancia, B) Transmitancia, C) Transflectancia y D) Interactancia....	105
Figura 3.5. Diagrama de un interferómetro de Michelson.	111
Figura 3.6. Esquema de un monocromador basado en tecnología AOTF.....	112
Figura 3.7. Esquema de un filtro lineal variable.....	113
Figura 3.8. Esquema de un diseño instrumental post-dispersivo que incorpora tecnología MEMS	114
Figure 3.9. Rejilla de difracción basada en un sistema MEMS.....	115
Figura 3.10. Características de diseño del instrumento Phazir TM	116
Figura 3.11. Posibles trayectorias aleatorias simuladas por Monte Carlo para un fotón viajando en un tejido	126

Figura 3.12. Diagrama de flujo seguida por la simulación Monte Carlo de la propagación de la luz en tejidos multi-capas	128
Figura 3.13. Esquema de medidas de reflectancia total (R_t) y transmitancia total (T_t) en esferas integradoras con configuración simple (a) o doble (b)....	131
Figura 3.14. Esquema sintético de las etapas necesarias para estimar las propiedades ópticas de un material mediante estrategias IAD o IMC	133
Figura 3.15. Diagrama de un goniómetro para determinar la función de fase de dispersión, $p(\theta)$	133
Figura 3.16. Esquema de medidas realizadas en Espectroscopía por Resolución Espacial.	134
Figura 3.17. Diagrama con las etapas básicas para desarrollar un modelo de calibración NIRS y su implantación como análisis de rutina.....	139
Figura 3.18. Algoritmos multivariantes más frecuentes para aplicaciones cuantitativas.	147
Figura 3.19. Esquema de funcionamiento de un algoritmo de regresión local.....	151
Figura 3.20. Clasificación general de algoritmos multivariantes para propósitos cualitativos.....	154
Figura 3.21. Esquema del sistema de escaneo de imágenes NIRS	163
Figura 3.22. Imagen del equipo “Nitfom Fat Quality Grading System”	163
Figura 4.1. Equipo Foss NIRSystems 6500 y cápsula giratoria utilizada para el análisis de carne picada	180
Figura 4.2. Equipo Phazir TM analizando carne picada	180
Figura 4.3. Equipo Foss NIRSystems 6500 y cápsula giratoria de transflectancia para el análisis de grasa fundida	181
Figura 4.4. Equipo Foss NIRSystems 6500 y fibra óptica de interactancia para el análisis de tejido adiposo subcutáneo intacto.....	181
Figura 4.5. Equipo Phazir TM 1640 analizando canales de cerdo ibérico en la línea de faenado	183
Figura 4.6. Sistema de doble esferas integradoras combinado con un sistema de medida de la transmitancia dispersa basado en un láser modulable como fuente de radiación	185
Figura 4.7. Medición de un trozo de tejido cutáneo porcino mediante espectroscopía por resolución espacial.	186
Figura 5.2.1. Evolución del porcentaje de luz reflejada por el material de referencia a lo largo del tiempo para los equipos MEMS-NIRS disponibles .	232

Figura 5.6.1. Diagrama de flujo de la interfaz gráfica de usuario diseñada para el análisis de datos espectroscópicos procedentes de equipos MEMS-NIRS portátiles.	362
Figura 5.5.2. Esquema de diseño de la interfaz gráfica de usuario	363
Figura 5.5.3. Disposición final de la interfaz gráfica de usuario.....	364
Figura 5.5.4. Portada del entorno web diseñado para acceder a las base de datos generadas con la información procedente de los análisis realizados con tecnología NIRS.....	366
Figura 5.5.5 Entorno de diseño (a) y programación (b) del software App Inventor utilizado en el desarrollo de la aplicación android.....	366
Figura 5.5.6. Aplicación android diseñada para generar/acceder a la base de datos virtual	366

Lista de abreviaturas y símbolos más frecuentes²

%: Porcentaje. (*Percentage*)

μ_{eff} : Coeficiente de atenuación efectivo. (*Effective extinction coefficient*)

μ'_s : Coeficiente de dispersión reducido. (*Reduced scattering coefficient*)

μ_a : Coeficiente de absorción. (*Absorption coefficient*)

μ_s : Coeficiente de dispersión. (*Scattering coefficient*)

μ_t : Coeficiente de extinción. (*Extinction coefficient*)

€: Euros.

AECERIBER: Asociación Española de Criadores de Ganado Porcino Selecto Ibérico Puro y Tronco Ibérico. (*Spanish Association of Pure Iberian Porcine and Iberian Branch Breeders*)

AESAN: Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. (*Spanish Food Safety and Nutrition Agency*)

AD: Adición-Duplicación. (*Adding-Doubling*)

ANAPORC: Asociación Nacional de Porcinocultura Científica. (*Scientific Swine Production Association*)

ANN: Redes Neuronales Artificiales. (*Artificial Neural Network*)

AOAC: Asociación Científica Dedicada a la Excelencia Analítica. (*The Scientific Association Dedicated to Analytical Excellence*)

AOTF: Filtros Acústico-Ópticos Modulables. (*Acousto-Optic Tunable Filters*)

ASICI: Asociación Interprofesional del Cerdo Ibérico. (*Interprofessional Association of the Iberian Pig*)

ASTM: Sociedad Americana de Ensayos y Materiales (*American Society for Testing and Materials*)

B: Bellota. (*Acorn*)

² En este trabajo se ha preferido utilizar la mayoría de las abreviaturas referentes a conceptos científicos u organismos internacionales en inglés al ser la forma más extendida en la comunidad científica y casi de uso universal.

BOE: Boletín Oficial del Estado. (*Official Journal of the Spanish State*)

BOJA: Boletín Oficial de la Junta de Andalucía. (*Official Journal of the Andalusian Regional Government*)

C: Carbono. (*Carbon*)

C16:0: Ácido palmítico. (*Palmitic acid*)

C18:0: Ácido esteárico. (*Stearic acid*)

C18:1: Ácido oleico. (*Oleic acid*)

C18:2: Ácido linoleico. (*Linoleic acid*)

CARNAC: Análisis Comparado usando Datos Reestructurados de Infrarrojo Cercano (*Comparison Analysis using Restructured Near Infrared Constituent Data*)

CI: Cerdo Ibérico. (*Iberian Pig, IP*)

CVA: Análisis de Variables Canónicas (*Canonical Variates Analysis*)

DE: Ecuación de Difusión. (*Diffusion Equation*)

DFD: Oscura, Firme y Seca. (*Dark purplish red, Firm and Dry*)

DIS: Doble Esferas Integradoras. (*Double Integrating Spheres*)

DOP: Denominación de Origen Protegida. (*Protected Designation of Origin*)

DOS: Objeto de colectivo de datos. (*Dataset Object*)

DS: Estandarización Directa. (*Direct Standardization*)

DT: *Detrending*.

DTS: Espectroscopía de Transformada Digital. (*Digital Transform Spectroscopy*)

ECVA: Análisis de Variables Canónicas Extendido. (*Extended Canonical Variate Analysis*)

EMA: Agencia Europea del Medicamento. (*European Medicament Agency*)

FAs: Ácidos Grasos. (*Fatty Acids*)

FDA: Administración de Alimentos y Drogas de los Estados Unidos de América (*Food and Drug Administration of the United States of America*).

FT: Transformada de Fourier. (*Fourier Transform*)

g: Factor de anisotropía. (*Anisotropy factor*)

GC: Cromatografía de Gases. (*Gas Chromatography*)

GG-MS: Cromatografía de Gases y Espectroscopía de Masas. (*Gas Chromatography-Mass Spectroscopy*)

GH: Distancia Global de Mahalanobis. (*Global Mahalanobis Distance*)

GKPF: Función de Fase Gegenbauer Kernel. (*Gegenbauer Kernel Phase Function*)

GUI: Interfaz Gráfica de Usuario. (*Graphical User Interfaces*).

HCA: Análisis Jerárquico de Agrupamientos. (*Hierarchical Cluster Analysis*)

HGPF: Función de Fase Henyey-Greenstein. (*Henyey-Greenstein Phase Function*)

H-PDLC: Filtros formados Holográficamente por Polímeros Dispersos de Cristales Líquidos. (*Holographically-formed, Polymer Dispersed Liquid Crystal*)

HPLC: Cromatografía Líquida de Alta Resolución. (*High-Performance Liquid Chromatography*)

I+D+i: Investigación, Desarrollo e Innovación. (*Research, Development and Innovation*)

IAD: Adición-Duplicación Inverso (*Inverse Adding-Doubling*)

IBERAICE: Asociación Española de Industrias Cárnicas del Cerdo Ibérico. (*Spanish Association of Iberian Pig Meat Industries*)

ICT: Tecnologías de la Información y de la Comunicación. (*Information and Communication Technologies*)

IMC: Monte Carlo Inversa (*Inverse Monte Carlo*)

IMS: Espectroscopía de Movilidad de Iones. (*Ion Mobility Spectroscopy*)

IRMS: Espectroscopía de Masas por Relación de Isótopos Estables. (*Isotope-Ratio Mass Spectrometry*)

IS: Esfera Integradora. (*Integrating Sphere*)

ISO: Organización Internacional de Normalización (*International Organization for Standardization*)

ISPA: Ingeniería de Sistemas de Producción Agroganaderos

KNN: K- Vecinos más Cercanos (*K-Nearest Neighbour*)

LBR: Regresión Local Sesgada (*Locally-Biased Regression*).

LCA: Algoritmo Central Local (*Local Central Algorithm*)

LCTF: Filtros de Líquido de Cristal Sintonizables. (*Liquid Crystal Tuneable Filters*)

LDA: Análisis Discriminante Lineal (*Linear Discriminant Analysis*)

LED: Diodo Emisor de Luz. (*Light-Emitting Diodes*)

LS-SVM: Máquinas de Vectores Soporte por Mínimos Cuadrados. (*Least Squares Support Vector Machines*)

LV: Variables Latentes (*Latent Variables*)

LVF: Filtros Lineales Variables. (*Linear Variable Filters*)

LWR: Regresión Local Ponderada. (*Locally Weighted Regression*)

MAGRAMA: Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (*Spanish Ministry of Agriculture, Food and Environment Affairs*)

MC: Monte Carlo.

MCML: Monte Carlo Multicapa. (*Monte Carlo Multi-Layered*)

MD: Distancia de Mahalanobis. (*Mahalanobis Distance*)

MEMS: Sistemas Micro-Electro-Mecánicos. (*Micro-Electro-Mechanical Systems*)

min: Minutos. (*Minutes*)

MIR: Infrarrojo Medio. (*Mid-Infrared*)

MLR: Regresión Lineal Múltiple. (*Multiple Linear Regression*)

MOEMS: Sistemas Micro-Opto-Electro-Mecánicos. (*Micro-Opto-Electro-Mechanical Systems*)

MPLS: Mínimos Cuadrados Parciales Modificados. (*Modified Partial Least Squares*)

MRI: Imagen de Resonancia Magnética. (*Magnetic Resonance Imaging*)

MS: Espectro de Masas. (*Mass Spectra*)

MSC: Corrección del Efecto Multiplicativo de la Dispersión. (*Multiplicative Scatter Correction*)

MUFA: Ácidos Grasos Monoinsaturados. (*Monounsaturated Fatty Acid*)

n: Índice de refracción. (*Refraction index*)

N: Nitrógeno. (*Nitrogen*)

NH: Distancia de Vecinos. (*Neighborhood Distance*)

NIR: Reflectancia del Infrarrojo Cercano. (*Near-Infrared Reflectance*)

NIRS: Espectroscopía de Reflectancia del Infrarrojo Cercano. (*Near Infrared Reflectance Spectroscopy*)

°C: Grados Celsius. (*Celsius Grade*)

- OSC: Corrección Ortogonal de la Señal. (*Orthogonal Signal Correction*)
- $p(\bar{s}, \bar{s}')$ o $p(\theta)$: Función de fase de dispersión. (*Scattering phase function*)
- P: Pienso. (*Feed*)
- PAO: Pienso Alto Oleico. (*High Oleic Feed*)
- PAT: Tecnologías Analíticas de Procesos. (*Process Analytical Technology*)
- PC: Componente Principal. (*Principal Component*)
- PCA: Análisis de Componentes Principales. (*Principal Component Analysis*)
- PCR: Regresión de Componentes Principales. (*Principal Component Regression*)
- PDS: Estandarización Directa por Tramos. (*Piecewise Direct Standardization*)
- PQ: Test de Validación de Funcionamiento. (*Performance Qualification*)
- PLS: Mínimos Cuadrados Parciales. (*Partial Least Squares*)
- PLS-DA: Análisis Discriminante de Mínimos Cuadrados. (*Partial Least Square-Discriminant Analysis*)
- PTR-ToF-MS: Espectrometría de masas de tiempo de vuelo por reacción de transferencia protónica. (*Proton Transfer Reaction Time of Flight Mass-Spectrometry*)
- PSE: Pálida, Blanda y Exudativa. (*Pale/pinkish-gray, Soft and Exudative*)
- Q: Residuales. (*Residuals*)
- R^2 : Coeficiente de determinación. (*Determination coefficient*)
- RD: Real Decreto.
- RFD: Identificación por Radio Frecuencia. (*Radio Frequency Identification*)
- RFN: Roja, Firma y No exudativa. (*Reddish-pin, Firm and Non-exudative*)
- RIBER: Registro Informativo de Organismos Independientes de Control del Ibérico. (*Information Register on Independent Iberian Control Bodies*)
- RMS: Raíz Media Cuadrática. (*Root Mean Square*)
- RMSE: Raíz Media Cuadrática del Error Típico. (*Root Mean Square Error*)
- RMSEC: Raíz Media Cuadrática del Error Típico de Calibración. (*Root Mean Square Error of Calibration*)
- RMSECV: Raíz Media Cuadrática del Error Típico de Validación Cruzada. (*Root Mean Square Error of Cross-Validation*)
- RMSEP: Raíz Media Cuadrática del Error Típico de Predicción. (*Root Mean Square Error of Prediction*)

RPD: *Residual Predictive Deviation*

R_t: Reflexión Total. (*Total Reflectance*)

RTE: Teoría de Transferencia Radiativa. (*Radiative Transfer Equation*)

S: Azufre. (*Sulphur*)

s: Segundos. (*Seconds*)

SD: Desviación Estándar. (*Standard Deviation*)

SDW: Diferencia Espectral por Longitud de Onda. (*Spectral Difference by Wavelength*)

SE: Error Típico. (*Standard Error*)

SEC: Error Típico de Calibración. (*Standard Error of Calibration*)

SECV: Error Típico de Validación. (*Standard Error of Validation*)

SED: Error Típico de Diferencia. (*Standard Error of Difference*)

SEL: Error Típico de Laboratorio. (*Standard Error of Laboratory*)

SEP (c): Error Típico de Predicción Corregido para el Sesgo. (*Standard Error of Prediction Corrected for Bias*)

SEP: Error Típico de Predicción. (*Standard Error of Prediction*)

SFA: Ácidos Grasos Saturados. (*Saturated Fatty Acid*)

SIMCA: Modelado Independiente Suave de Analogía de Clases. (*Soft Independent Modelling of Class Analogy*)

SLED: Diodo Emisor de Luz Superluminiscente. (*Superluminescent Light-Emitting Diodes*)

SNR: Relación Señal-Ruido. (*Signal-to-Noise Ratio*)

SNV: *Standard Normal Variate*.

SRS: Espectroscopía por Resolución Espacial. (*Spatially Resolved Spectroscopy*)

STD: Desviación Estándar. (*Standard Deviation*)

SVM: Máquina de Vectores Soporte (*Support Vector Machine*)

T²: Valores Hotelling. (*Hotelling Values*)

T_c: Transmisión Colimada. (*Unscattered Transmission*)

TG: Triglicéridos. (*Triacylglycerols*)

TRS: Espectroscopía de Resolución temporal. (*Time-Resolved Spectroscopy*)

T_t: Transmisión Total. (*Total Transmission*)

UCO: Universidad de Córdoba. (*University of Córdoba*)

UMTS: Sistema Universal de Telecomunicaciones Móviles. (*Universal Mobile Telecommunications System*)

USDA: Departamento de Agricultura de los Estados Unidos. (*United State Department of Agriculture*)

δ : Ratio isotópico. (*Isotopic ratio*)

Λ : Albedo.

λ : Longitud de onda. (*Wavelength*)

INTRODUCCIÓN



1. Introducción

El sector del cerdo ibérico, caracterizado tradicionalmente por estar ligado al ecosistema dinámico de la dehesa dentro de un sistema productivo extensivo del cual se obtienen productos cárnicos selectos y de alto valor en el mercado nacional e internacional, ha evolucionado incorporando otros sistemas productivos intensivos o mixtos. En dicha evolución, dos aspectos claves han influido en el sector como son el cruce de la raza ibérica con otras más magras, y que proporcionan mejores rendimientos cárnicos y productivos, así como la utilización de fuentes de alimentación constituidas por piensos compuestos.

Numerosos trabajos de investigación han demostrado que existen distintos factores que pueden influir en la calidad final (composición química, nutritiva, características texturales y sensoriales) de los productos derivados del cerdo ibérico, pero son aquellos relacionados con la alimentación recibida durante el periodo de engorde previo al sacrificio los que determinan en mayor parte esas características finales, tanto cuantitativamente como cualitativamente. Esto se ha reflejado en la legislación española dentro de la “norma de calidad para la carne, el jamón, la paleta y la caña de lomo ibéricos” que regula la transparencia del sector, estableciendo distintas categorías comerciales y sistemas de control para evitar fraudes, basados actualmente en inspecciones en campo. No obstante, ciertas limitaciones se han puesto de manifiesto en cuanto a estos controles oficiales, tales como su subjetividad y alto coste. Asimismo, diversos trabajos también han mostrado las limitaciones de otros sistemas de control, vigentes en normativas anteriores, como el análisis del tejido adiposo subcutáneo por cromatografía de gases.

Distintos equipos de investigación han realizado diversos estudios para caracterizar y discriminar las distintas categorías comerciales en base a diferentes metodologías analíticas o técnicas instrumentales. Desde hace unos años, todos los participantes de la cadena productiva, transformadora y comercial, e incluso los consumidores, demandan un cambio en la actual normativa que simplifique, clarifique y certifique los productos que llegan al mercado y, que es sabido, que alcanzan elevados precios en el mismo. Esto unido al reajuste que está ocurriendo en la cabaña de cerdos ibéricos y de la oferta/demanda de sus productos derivados, debido a la actual crisis económica y financiera, hace que se abran nuevas oportunidades para considerar y establecer otros sistemas de control de calidad y autenticación fundamentados en técnicas científicas que contribuyan a disponer de una metodología correcta de clasificación de la materia prima. De esta forma, se podrían evitar errores de identificación y fraudes. Además, el consumidor percibiría una mayor protección a la hora de adquirir estos productos. Por tanto, las particulares características de este sector hacen que sea necesario investigar, desarrollar y fomentar sistemas de control de calidad basados en técnicas de muestreo fiables, objetivas, rápidas, de bajo coste e, idealmente, no

destruictivas, que aporten una imagen de confianza a los consumidores. Por otra parte, sería conveniente que tales sistemas permitieran identificar la calidad individual de cada animal para que el pago a los ganaderos no se realizara en base a resultados medios de lotes de animales, como está implementado actualmente. Estos sistemas de control deseables también deberían permitir diseñar rigurosos sistemas de controles internos y/o autocontrol de la calidad, tanto de las materias primas que llegan a la industria de transformación como del proceso/producto obtenido, para tomar decisiones en tiempo real y de forma eficiente que homogenicen el proceso, certifiquen la calidad y aporten una imagen de marca vanguardista.

La espectroscopía de reflectancia del infrarrojo cercano (NIRS, por sus siglas en inglés) ha demostrado su viabilidad en el control de calidad en el sector del cerdo ibérico. De hecho, diferentes trabajos de investigación y transferencia han permitido la implantación de la tecnología NIRS como herramienta de control analítico en laboratorio de productos derivados del cerdo ibérico. No obstante, los avances en instrumentación hacen que sea posible pensar que esta tecnología pueda ser ubicada *in situ/on-line* en la línea de procesado, con la incorporación de equipos portátiles de reducido tamaño. Esto podría resultar de gran interés, tanto para la industria como para legisladores y consumidores, al ser una herramienta rápida, simple, económicamente eficiente y que puede permitir un control individualizado de la producción.

El grupo de investigación “Ingeniería de Sistemas de Producción Agroganaderos” (ISPA), en el cual se ha desarrollado la presente tesis doctoral, viene realizando, desde la década de los noventa, una intensa actividad investigadora y de transferencia en el uso de sensores NIRS para el control de calidad de productos y procesos agroalimentarios. Esto ha posibilitado el generar un amplio conocimiento científico y avances importantes en el caso concreto del cerdo ibérico.

En el ámbito de productos cárnicos derivados del cerdo ibérico, el trabajo científico se ha centrado en demostrar el potencial de la tecnología NIRS para el control de parámetros de composición como porcentaje de grasa, humedad y proteína en carne picada analizada en condiciones de laboratorio usando equipos de alta prestaciones científico-técnicas. Sin embargo, en los años de uso de dichas ecuaciones se han detectado problemas que dificultan el uso en rutina. Por tal razón, en esta tesis se aborda el desarrollo y evaluación de estrategias o metodologías que permitan el desarrollo, control y mantenimiento de calibraciones NIRS robustas, basadas en amplias bases de datos generadas durante varios años, en distintos productos obtenidos del cerdo ibérico.

La mayoría del conocimiento relacionado con el binomio sector cerdo ibérico-tecnología NIRS se ha generado en cuanto al análisis de grasa fundida e intacta en espectrofotómetros de altas prestaciones científico-técnicas, trabajando en condiciones controladas de laboratorio, para el control de

diversos parámetros de calidad como el perfil de ácidos grasos o para autenticar el régimen alimenticio de los animales. Actualmente, el interés científico se centra en el desarrollo de aplicaciones *in situ* y no destructivas para el control de esos parámetros de calidad, que permita dotar a los distintos agentes del sector de un sistema de certificación o de apoyo a la toma de decisiones en tiempo real y de forma individualizada. No obstante, estas aplicaciones están todavía lejos de ser una realidad en el sector agroindustrial.

En el terreno instrumental, la reciente aparición en el mercado de equipos NIRS portátiles, como los basados en los sistemas micro-electro-mecánicos, que pueden conllevar diversas ventajas técnicas, funcionales y económicas en cuanto al análisis NIRS hace que se planteen nuevas estrategias para alcanzar el objetivo de poder realizar un control *in situ* y no destructivo en la industria de transformación cárnica. Por ello, en el presente documento, se recogen, por primera vez, distintos experimentos en los que se evalúa y compara el potencial de estos nuevos espectrofotómetros portátiles miniaturizados, trabajando en condiciones reales en la industria, con equipos de laboratorio. Además, se discuten posibles recomendaciones adaptativas y/o mejoras instrumentales y del procesamiento de los datos espectrales para progresar en el diseño y desarrollo de plataformas de apoyo a la toma de decisiones en la industria del cerdo ibérico basadas en sensores NIRS. Por otro lado, se evalúan estrategias de transferencia de bases de datos espectrales y calibraciones entre espectrofotómetros de laboratorio y portátiles, que difieren en características ópticas y técnicas, con el objetivo de poner en valor los colectivos de muestras ya analizados, que pueden tener una enorme relevancia en cuanto a la representatividad de la variabilidad del producto, y todo el esfuerzo científico, técnico, económico y personal generados a lo largo de varios años.

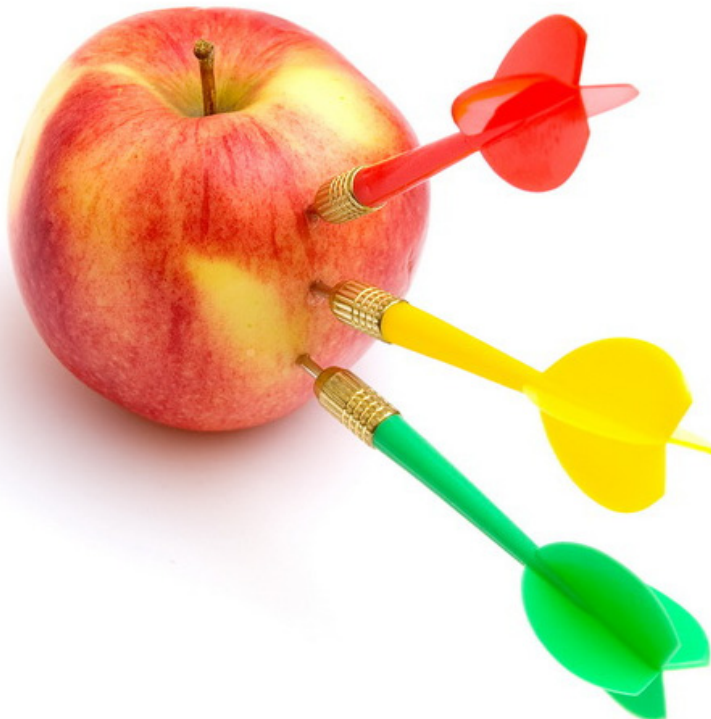
La aparición de estos instrumentos NIRS portátiles, además, ha permitido el diseño y evaluación de nuevas aplicaciones en el sector del cerdo ibérico como el control *in vivo* de los animales. Esto es una aproximación muy útil para el ganadero al estar actualmente prohibido, por la normativa de bienestar animal, el realizar biopsias a los animales, las cuales se usaban anteriormente para ajustar el racionamiento de éstos y decidir el momento adecuado de sacrificio de los mismos. En este sentido, un trabajo reciente desarrollado por investigadores del ISPA mostraba que si bien es viable el análisis NIRS *in vivo* de cerdos ibéricos y *on-line* de canales no procesadas para la predicción del perfil de ácidos grasos, se producía una pérdida considerable en la capacidad predictiva de los modelos. Una de las primeras cuestiones que se derivan de dicho trabajo es si las medidas realizadas sobre la piel están correlacionadas con la composición de ácidos grasos de la grasa subcutánea analizada por cromatografía de gases o no. Esto genera diversos interrogantes entre los que se puede formular si, verdaderamente, en medidas realizadas sobre la piel se detecta información espectral procedente del tejido de interés.

En los últimos años, en el sector agroalimentario, se están iniciando estudios, que anteriormente estaban ligados a otras áreas del conocimiento como biomedicina, relacionados con la caracterización óptica de los tejidos biológicos para poder estudiar y entender cómo se propaga la luz en los mismos. De esta forma, los conocimientos generados pueden permitir avanzar en el diseño de nueva instrumentación NIRS adaptada y/o procesamiento de datos espectrales para obtener información de interés de productos intactos o animales vivos.

Rutinariamente, en el ámbito de la tecnología NIRS, la aplicación ha ido por delante del conocimiento científico-básico para entender qué ocurre. De hecho, esto es lo que ha ocurrido en el sector del cerdo ibérico y en otras muchas aplicaciones no destructivas en el sector agroalimentario, por lo que el diseño de estudios que den respuesta a esas cuestiones de carácter básico es fundamental para poder profundizar en el entendimiento de la propagación de la radiación NIR en los tejidos biológicos.

Por todo ello, la presente tesis doctoral trata de profundizar en diferentes aspectos, que aún necesitan de una mayor investigación, y que se concretan en los objetivos.

OBJETIVOS



2. Objetivos

Objetivo general:

Diseñar, desarrollar, evaluar y optimizar metodologías de control de calidad de productos y procesos *in situ* en la industria de transformación del cerdo ibérico mediante el empleo de sensores basados en la tecnología NIRS.

Objetivos específicos:

1.- Desarrollo y validación de metodologías para la obtención de modelos predictivos NIRS robustos a partir de amplias bases de datos espectrales de productos cárnicos porcinos obtenidas a lo largo de diversos años [*El cumplimiento del objetivo ha sido abordado en la publicación titulada “Monitoring NIRS calibrations for use in routine meat analysis as part of iberian pig-breeding programs” (Food Chemistry, 2011, 129, 1889-1897) y en los estudios “Supervisión y recalibración de modelos NIRS para la predicción de ácidos grasos en muestras de grasa subcutánea fundida de cerdo ibérico” y “Supervisión y recalibración de modelos NIRS para la predicción de ácidos grasos en muestras de grasa subcutánea intacta de cerdo ibérico” del apartado 5.1*].

2.- Evaluación y optimización de equipos portátiles MEMS-NIRS para su implementación *in situ* en el control de calidad y autenticación de productos del cerdo ibérico. [*El cumplimiento del objetivo ha sido llevado a cabo en el apartado 5.2. titulado “Optimización de parámetros instrumentales y protocolo para el análisis espectral de productos cárnicos con equipos MEMS-NIRS portátiles”*].

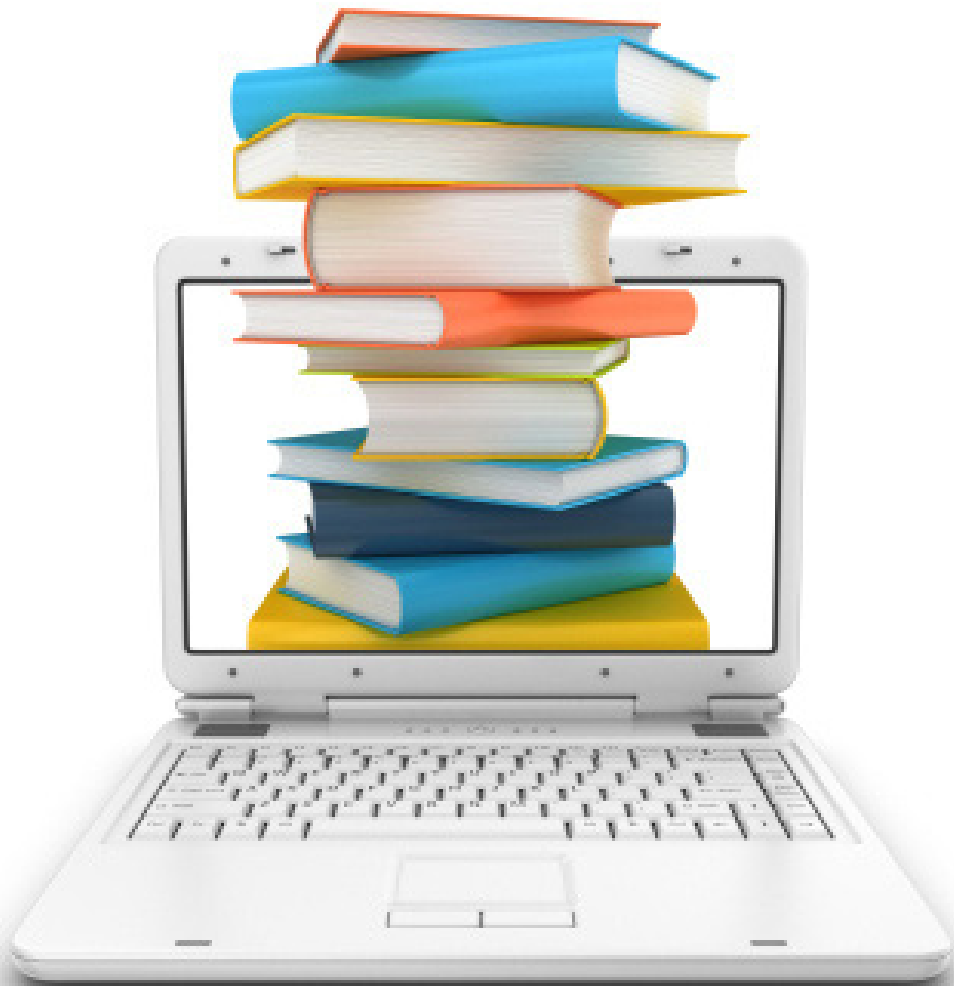
3.- Desarrollo y evaluación de modelos multivariantes cualitativos y cuantitativos para la autenticación y predicción *in situ* de parámetros de calidad en canales de cerdo ibérico. [*Dicho objetivo ha sido realizado en las publicaciones del apartado 5.3: “In-situ iberian pig carcass classification using a micro-electro-mechanical system (MEMS)-based near infrared (NIR) spectrometer” (Meat Science, 2012, 90, 636-642), “Evaluación de distintos algoritmos cualitativos para la clasificación in situ de canales de cerdos ibéricos en función de su régimen alimenticio” y en “Prediction of fatty acid content in pig adipose tissues by near infrared spectroscopy: at-line versus in-situ analysis” (Meat Science, enviado)*].

4.- Desarrollo y validación de metodologías para la transferencia de bases de datos y calibraciones *at-line* (desarrolladas en laboratorio) a nuevos equipos MEMS-NIRS portátiles para el control de calidad de productos cárnicos de cerdo ibérico. [*Este objetivo ha sido cumplido en la publicación del apartado 5.4 titulada: “Handheld NIRS analysis for routine meat quality control: database transfer from at-line instruments” (Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, 2012, 114, 30-35)*].

5.- Profundizar en las bases de propagación de la radiación NIR a través de tejido cutáneo y adiposo porcino [*Este objetivo ha sido abordado y cumplido en los estudios del apartado 5.5 titulados: “Double Integrating Spheres measurements for estimating optical properties of pig subcutaneous adipose tissue” (Food and Bioprocess Technology, enviado), “Optical properties of pig skin epidermis and dermis estimated with double integrating spheres measurements” (Innovative Food Science and Emerging Technologies, enviado) y “Depth profile of diffuse reflectance near-infrared spectroscopy of non-invasive pig skin measurements”(Food and Bioprocess Technology, enviado)*].

6.- Diseño y desarrollo de una plataforma informática de análisis de datos espectrales NIRS como sistema de apoyo a la toma de decisiones en tiempo real en la industria de transformación del cerdo ibérico [*Este objetivo queda cumplido en el apartado 5.6 denominado “Diseño de plataformas de apoyo a la toma de decisión en la industrial del cerdo ibérico basadas en la tecnología NIRS”*].

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA



3. Revisión bibliográfica

3.1. Escenario productivo-económico del sector del cerdo ibérico

El cerdo ibérico (CI) (cuyo antecesor es *Sus mediterraneus*) es una especie autóctona-local del suroeste de la Península Ibérica (regiones españolas de “Andalucía”, “Extremadura”, “Castilla La Mancha” y “Castilla y León” y portuguesas del “Algarve” y “Alentejo”), que incluye diversas líneas o razas, con la piel tanto negra como rojiza (Murriel et al., 2004), adaptadas a las más de 6 millones de hectáreas del ecosistema agro-silvo-forestal denominado dehesa. Este término es definido, por la Ley de la Dehesa de la Junta de Andalucía (BOE, 2010a), como el sistema agro-silvo-forestal constituido por un estrato arbóreo fundamentalmente compuesto por encinas, alcornoques y acebuches, aunque otras especies arbóreas pueden estar presentes, y que permite el crecimiento de un estrato arbustivo y herbáceo disponible para el uso del ganado en un sistema de producción extensivo; permitiendo a su vez el desarrollo de otras actividades forestales, agrícolas, ganaderas y cinegéticas.

Esta especie porcina de crecimiento graso lento, prolificidad baja y con un índice de conversión también bajo, ha sido tradicionalmente explotada en condiciones extensivas en la dehesa durante el periodo final de engorde/engrasamiento para la producción de productos cárnicos de excelente calidad y con un alto valor añadido en el mercado (López-Bote, 1998; De Pedro, 2001; Daza et al., 2006; Bonneau y Lebrét, 2010). Este sistema productivo tradicional, binomio casi simbiótico cerdo ibérico-dehesa, era el único implantado hasta finales de la década de los ochenta y principio de los noventa, proporcionando las características extraordinarias de calidad y excelencia a los productos derivados del CI, muy valoradas en el mercado. Más tarde, otros productores se valieron de este prestigio mundial para incorporarse al sector y responder a las demandas de productos ibéricos tanto del mercado español como internacional, aunque implementando sistemas productivos basados en animales cruzados con duroc - raza introducida en la década de los sesenta y cuyo cruce con ibérico, siempre por vía paterna, está permitido en la actual legislación vigente de calidad de este sector para mejorar el rendimiento a la canal, reducir los costes de producción, aumentar los índices de conversión y la prolificidad de los animales (Serrano et al., 2008a), aunque afecta a la calidad de los productos frescos y derivados obtenidos (Ramírez y Cava, 2007a, 2008) - criados y engordados en sistemas intensivos donde son alimentados con piensos compuestos dado que no existen suficientes recursos naturales en la dehesa para toda la demanda. No obstante, hay que tener presente que esa exclusividad de los productos ibéricos vienen definida por la relación entre la raza con su producción extensiva en la dehesa, binomio no exportable fuera de nuestras fronteras.

A principios del siglo XXI, el sector del cerdo ibérico todavía estaba en expansión dado el bajo coste de las materias primas utilizadas en alimentación, la alta demanda de productos y el incremento de los precios de productos procedentes de cerdos blancos, lo cual transfirió clientes al sector del CI, tradicionalmente considerado de mejor calidad (Alimarket, 2002). Las empresas tradicionales de CI invirtieron en incrementar su capacidad productiva o de transformación de nuevos productos. Al mismo tiempo, grandes empresas españolas, tradicionalmente vinculadas al sector porcino blanco, empezaron a abrir mercado en el sector del CI (El Pozo Alimentación), e incluso empresas de otros sectores productivos como bodegas (Bodegas Barbadillo o Williams Humbert) o del sector constructivo (Vemusa). Hoy en día, la imagen del sector del CI es un poco distinta. Todavía existen balances satisfactorios, pero con una realidad incierta y diversos factores influyendo en la dirección que puede tomar el sector: nueva Norma de Calidad del sector, reducción de los censos de animales, caída generalizada del consumo y valor medio de los productos derivados del cerdo ibérico (ASICI, 2012a y 2012b). Desde 2007, excepto en un corto periodo en 2010, el precio de los piensos compuestos ha ido incrementándose, teniendo mayor impacto en la producción en intensivo que en extensivo. La misma tendencia ha ocurrido con los gastos de luz, gas, combustible y los derivados de la entrada en vigor de las nuevas normativas de bienestar animal, control de calidad y trazabilidad. Además, desde 2009, aunque con un impacto más pronunciado desde 2011, la crisis económica y financiera global de los mercados está afectando a la demanda de productos derivados del cerdo ibérico y a la financiación de las empresas vinculadas, debido a la gran cantidad de productos que tiene que estar inmovilizados hasta su venta (un jamón necesita como mínimo un periodo de curación de dos años para salir al mercado).

El número de cabezas de ganado porcino sacrificado en España se ha incrementado entre 2010 y 2011 en un 2,19 %, con un total en ese último año de 41,74 millones (MAGRAMA, 2012a). Los resultados provisionales de las encuestas de sacrificio del pasado año (2012) muestran unos valores muy similares a los registrados en los mismos periodos del año anterior. No obstante, el número de reproductores se ha reducido en las últimas fechas. Esto indica que en futuras campañas se verá reducido el número de animales producidos. Esta misma tendencia decreciente en el número de cabezas reproductoras ha ocurrido también en el sector del cerdo ibérico en los últimos años.

La producción de CI ligada a la dehesa está concentrada en varias regiones españolas (Andalucía, Extremadura, Castilla la Mancha y Castilla y León) y portuguesas (Algarve y Alentejo). Desde 2007, este sector está regulado por una Norma de Calidad específica (BOE, 2007a) donde existe un registro de animales y productos comercializados (Registro Informativo de Organismos Independientes de Control de Ibérico, RIBER). Este registro tiene, no obstante,

sus limitaciones dado que sólo los productos y animales ibéricos comercializados bajo Norma de Calidad e inspeccionados por organismos de inspección autorizados son incluidos en él. En España, algunas Denominaciones de Origen Protegidas (DOP) (*Los Pedroches* y *Dehesa de Extremadura*) hacen sus propios controles, reconocidos por la Norma de Calidad, pero no aportan esa información al registro. Además, algunas empresas del sector tienen sus propias marcas que comercializan fuera de la Norma de Calidad (Lára-Vélez, 2011). Por tanto, todos estos animales y productos no se ven contabilizados en el RIBER.

La Tabla 1.1 muestra la evolución de los datos RIBER entre 2008 y 2011. Al final del 2011, 2,62 millones de cerdos ibéricos estaban censados bajo la Norma de Calidad (MAGRAMA, 2012b). Esto representa un descenso del 37,16 % en el número de animales, en comparación con los datos del año 2008, viéndose todas las categorías comerciales afectadas de una u otra manera. De hecho desde 2008, la tendencia general de la cabaña porcina ibérica es la reducción de la misma, excepto en 2011 que en comparación con 2010 ha habido un incremento de la cabaña del 1,66 % (MAGRAMA, 2012b). Si se comparan los datos del 2008 con el 2011 se observa que ha habido una reducción de la cabaña en todas las categorías comerciales relacionadas con el régimen alimenticio, excepto en el caso del “recebo” y “cebo de campo” (no obstante, son categorías comerciales minoritarias), ya que fueron categorías creadas en aquel momento. Comparando sólo los datos entre 2010 y 2011, se observa que, aunque en números globales ambos años estén equiparados, hay claras diferencias en la evolución que ha ocurrido tanto entre tipos genéticos como en número de animales por categoría comercial según régimen alimenticio. Si bien los animales “ibéricos puros” (100 % ibérico) han disminuido en un 53 %, el número de “ibéricos” (50-75 % ibérico cruzado con duroc) han crecido un 9,6 %. En cuanto a las categorías comerciales por régimen alimenticio, los cerdos de “bellota” han disminuido un 23 %, siendo más acentuado el descenso de la cabaña en los animales puros producidos en este sistema. El “recebo” se ha mantenido entre 2010 y 2011, aunque ha habido un incremento de los animales “ibéricos” de esta categoría, frente al descenso del 52 % en los “ibéricos puros”. El “cebo de campo” también ha sufrido un descenso en el número de animales, más pronunciado en los “ibéricos puros”. Los animales de “cebo” son la única categoría que se ha incrementado significativamente, un 9,9 % de forma conjunta. Los “ibéricos” de “cebo” crecieron un 12 %, mientras que los “ibéricos puros” de “cebo” disminuyeron un 46 %.

Tabla 1.1. Evolución del censo de animales registrados en RIBER entre 2008 y 2011.

	2008	Ev.	2009	Ev.	2010	Ev.	2011
Ibérico puro bellota	283.052	>	254.231	>	252.370	>	114.324
Ibérico bellota	620.194	>	598.859	>	361.053	>	360.590
Total bellota	903.246	>	853.090	>	613.423	>	474.914
Ibérico puro recebo	19.747	<	20.496	>	3.445	>	1.668
Ibérico recebo	42.694	>	29.818	>	12.372	<	14.047
Total recebo	62.441	>	50.314	>	15.817	>	15.715
Ibérico puro cebo de campo	1.271	<	15.215	>	5.199	>	2.520
Ibérico cebo de campo	8.028	<	31.654	<	37.888	>	35.946
Total cebo campo	9.299	<	46.869	>	43.087	>	38.466
Ibérico puro cebo	213.102	>	93.668	>	71.747	>	38.661
Ibérico cebo	2.982.957	>	1.904.278	>	1.833.891	<	2.055.866
Total cebo	3.196.059	>	1.997.946	>	1.905.638	<	2.094.527
Total ibérico puro	517.172	>	383.610	>	332.776	>	157.173
Total ibérico	3.653.875	>	2.564.609	>	2.245.204	<	2.466.449
Totales	4.171.045	>	2.948.219	>	2.577.980	<	2.620.885

Fuente: MAGRAMA (2012b). Ev.: evolución.

Estos datos ponen de manifiesto el reajuste que en los últimos años está sufriendo el sector. Se observa la predominancia del cerdo “ibérico” (cruzado con duroc) frente al “ibérico puro” y de la producción intensiva referente a la categoría “cebo”. Por otra parte, la Figura 1.1 muestra el número de animales comercializados bajo la Norma de Calidad según las distintas categorías comerciales relacionadas con el régimen alimenticio en las campañas³ 2009/2010 y 2010/2011. En la campaña 2009/2010, fueron censados alrededor de 2,56 millones de animales, de los cuales el 71,25 % fueron “cebo”, 26,38 % “bellota”, 1,61 % “cebo de campo” y un 0,75 % pertenecieron a la categoría “recebo”. Estos datos indican que hay unas categorías comerciales minoritarias (“cebo de campo” y “recebo”) y otras dos mayoritarias (“cebo” y “bellota”). Estos datos, en comparación con la campaña 2010/2011, muestran una tendencia dispar para cada categoría comercial, mientras la categoría “cebo” se

³ Los datos proporcionados por RIBER se presentan de forma anual. No obstante, en este documento los censos se presentan por campañas para estar en más concordancia con la dinámica del sector. Se entiende por campaña al periodo de 12 meses que empieza con la matanza de cerdos de “bellota” en diciembre.

incrementó en 228.302 cabezas, la categoría “bellota” se redujo en 184.035 cabezas. Por su parte, el censo de animales de “cebo de campo” se mantuvo prácticamente estable y el de “recebo” se redujo en 5.049 cabezas. Si los datos del censo se analizan en función del genotipo (“ibérico puro” = 100 % ibérico o “ibérico” = 50 - 75 % ibérico), hay una clara tendencia decreciente en animales puros frente a cruzados. De representar el 13,85% de la cabaña en 2009/2010, han pasado al 6,26 % en 2010/2011, mientras los ibéricos cruzados con duroc han pasado del 86,15 % en 2009/2010 al 93,74 % en 2010/2011, donde la mayoría de ese tipo genético predominante se produce bajo las condiciones de “cebo”.

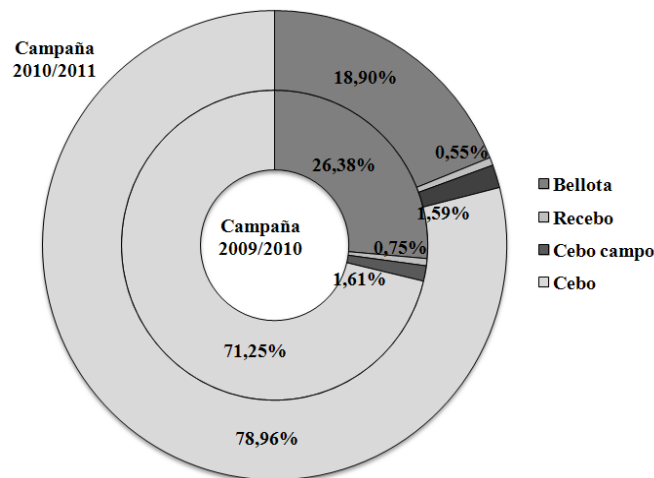


Figura 1.1. Número de animales sacrificados bajo Norma de Calidad según regimen alimenticio en las campañas 2009/2010 y 2010/2011.

Adaptado de ASICI (2012a).

Los datos preliminares disponibles de la campaña 2011-2012 muestran que se sacrificaron 434.184 animales de “bellota” y 19.131 de “recebo”, lo que indica una reducción del 11,6 % en el número de animales con respecto a la montanera de la campaña anterior para “bellota” y un incremento del 25,3 % en el caso del “recebo”. Si bien, en general, en esta última campaña el número de animales que reduce su cabaña son los animales “ibéricos”, manteniéndose casi estables los “ibéricos puros” (ASICI, 2012c).

El sector ganadero del cerdo ibérico tiene una importante relevancia económica. Considerando la producción española de la campaña 2010/2011 y los precios medios alcanzados en la campaña 2011-2012 en la lonja de Salamanca (Figura 1.2) (hay que tener en cuenta que los precios pueden fluctuar durante la campaña y la lonja de referencia), el sector CI puede mover aproximadamente 59 millones de euros (€) en ganado vivo de alrededor 150-160 kg/animal, listos para ser sacrificados en el matadero. Unos años atrás, los precios medios alcanzados por las distintas categorías comerciales según régimen alimenticio de CI en la misma lonja de ganado española fueron muy

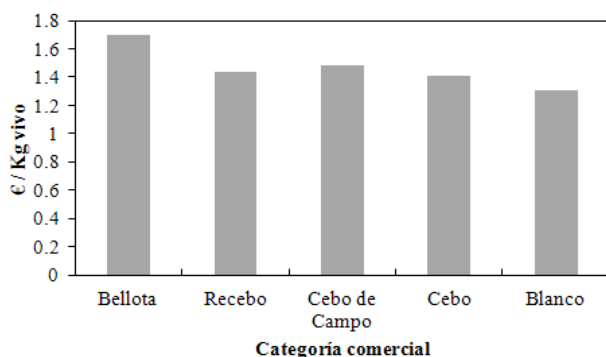


Figura 1.2. Precios medios alcanzados en la lonja de ganado de Salamanca en la campaña 2011/2012 para los distintos regímenes alimenticios.

Fuente: www.dipsanet.es/lonja.

de la montanera en 2011-2012 no permitieron una producción excelente de bellota como en otras campañas, por lo que los industriales verán afectada la calidad de su producción. Algo similar está ocurriendo en la actual campaña 2012-2013, aunque se ha observado que los precios de los animales listos para sacrificio de “bellota” están volviendo a niveles de 2010.

Todo este panorama muestra el reajuste que está sufriendo el sector en los últimos años. En 2007, el sector sufrió un primer reajuste dada la caída de precios en el mercado y un incremento de los precios de las materias primas para alimentación. En aquel momento, y como una demanda propia del sector, el gobierno español publicó una Norma de Calidad (BOE, 2007a) que regula a los productos derivados del cerdo ibérico. Esta normativa proporciona información a los consumidores, promueve un comercio transparente, establece un sistema de control e inspección para unificar la industria y preservar el modelo productivo tradicional. Además, considera conforme al régimen alimenticio y al sistema productivo, cuatro categorías comerciales: “bellota” (animales criados en extensivo durante al menos los 2 meses previo al sacrificio que se han alimentado exclusivamente con pastos y bellotas durante esa fase de montanera), “recebo” (animales alimentados con bellotas y pastos complementada con pienso en un sistema extensivo durante el periodo final de engorde), “cebo” (animales alimentados con piensos compuestos en intensivo/rejilla) y “cebo de campo” (animales alimentados con piensos compuestos en sistema extensivo)⁴ (Tabla 1.2).

⁴ Estos términos han sido traducidos en las publicaciones internacionales como: “Bellota”=“Acorn”; “Recebo”=“Recebo”; “Cebo de Campo”=“Field Feed”; “Cebo”=“Feed”.

Tabla 1.2. Aspectos regulados por la Norma de Calidad (BOE, 2007a) para cada categoría comercial de CI según régimen alimenticio.

	Bellota	Recebo	Cebo de campo	Cebo
Peso vivo al inicio de la montanera⁵ (kg)	92-115	92-115	92-115	-
Periodo de entrada en montanera	01/10-15/12	01/10-15/12	-	-
Mínima reposición en montanera (kg)	46	29	-	-
Estancia mínima en montanera(días)	60	60	-	-
Periodo de sacrificio	15/12- 15/04	15/12 – 15/05	Todo el año	Todo el año
Mínima edad de sacrificio (meses)	14	14	12	10
Peso medio mínimo en sacrificio (kg)	117	117	117	117
Peso mínimo individual a la canal en sacrificio (kg)	108	108	108	108
Carga ganadera (cerdos/ha)	≤ 2	≤ 2	≤ 15	-
Montanera en dehesa	Parcelas aprobadas por SIGPAC	Parcelas aprobadas por SIGPAC	-	-

Fuente: Elaboración propia.

Estas categorías están basadas en el impacto que, principalmente, el régimen alimenticio de los animales durante el periodo final de engorde tiene en la composición de ácidos grasos y en la distribución de la grasa en el tejido (Carraspiso et al, 2003a; Petrón et al., 2004b; Daza et al., 2006; Tejerina et al. 2012a; ver también sección 3.2.1) frente a otros factores como el genotipo (Ramírez y Cava, 2007a, 2007b; Serrano et al., 2008a), género (Serrano et al., 2008a, 2008b), régimen alimenticio durante el periodo previo al engorde final (Daza et al., 2005a), edad de entrada en montanera (Daza et al., 2007; Rodríguez-Sánchez et al., 2010; Soto et al., 2010), edad y peso al sacrificio (Serrano et al., 2008a), condiciones agroclimáticas y recursos naturales disponibles durante montanera (Tejerina et al., 2011, 2012b) o sistema productivo (Bonneau y Lebret, 2010).

Hoy en día, todos los participantes de la cadena productiva consideran que la Norma de Calidad puede ser mejorada. Desde el año 2011, el Ministerio

⁵ Montanera es el periodo en el que los animales están en extensivo comiendo recursos naturales en la dehesa.

español de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (MAGRAMA) ha iniciado un proceso de modificación de la actual norma del cerdo ibérico con el objetivo de armonizar intereses y satisfacer a todas las partes (Eurocarne, 2011). Con anterioridad a esa fecha, ya existían voces en el sector e informes de profesionales que indicaban los puntos débiles de la Norma de Calidad. En el plan estratégico del sector del cerdo ibérico, desarrollado por la Interprofesional del Cerdo Ibérico y el grupo de investigación ISPA de la Universidad de Córdoba, se exponen diversas cuestiones de la normativa del año 2007 que presentan cierta controversia: sistema de autenticación, máxima carga ganadera por hectárea, periodo de matanza para pertenecer a una categoría u otra o los términos referidos a la pureza o cruzamiento de los animales (UCO-ASICI, 2009).

Así, en los últimos tiempos, diversos agentes del sector del cerdo ibérico están a favor del cambio de la Norma de Calidad, aunque en sentidos diversos. Una parte del sector, apoyado por la Junta de Andalucía, defiende la promoción de la pureza del cerdo ibérico, denominando a los productos que actualmente se clasifican como “ibéricos puros” (100 % ibéricos) simplemente “ibéricos” y a los que la Norma de Calidad actual denomina como “ibérico” que pasen a denominarse “cruzado con ibérico” para así clarificar al consumidor lo que realmente está consumiendo y defender la raza ibérica, y la simplificación de las categorías comerciales según régimen alimenticio a dos: “bellota” (entendida como animales producidos en extensivo, es decir, englobaría a las actuales denominaciones de “bellota” y “recebo”) y “cebo” (entendido como aquellos animales producidos en intensivo) (UCO, 2011; Junta de Andalucía, 2012). Otra parte del sector, apoyado por otras comunidades autónomas como Extremadura y Castilla y León, no quieren modificar los aspectos relativos a las denominaciones raciales, pero sí tienen sus propios criterios en cuanto al régimen alimenticio (Tabla 1.3). No obstante, todos coinciden en que es necesario aportar propuestas de modificación en aspectos como: sistemas de garantía de calidad y trazabilidad de los productos, medidas para preservar el uso de animales de raza ibérica, clarificación de la norma y medidas para garantizar el cumplimiento de la misma. En la Tabla 1.3 se resumen los principales cambios que propusieron para modificar la Norma de Calidad del año 2007 en referencia a las denominaciones y/o etiquetado de productos ibéricos, aspecto más controvertido.

Si bien la propuesta de la Junta de Andalucía (Junta Andalucía, 2012), como se ha expuesto anteriormente, hace una defensa del sistema tradicional productivo de cerdo ibérico en la dehesa, su propuesta no ha sido muy bien acogida por otras comunidades como Castilla y León, principal productora de animales cruzados producidos en sistemas intensivos. La Junta de Extremadura también presentó al MAGRAMA una propuesta, “Acuerdo Estratégico del Ibérico Extremeño” (Junta de Extremadura, 2012) cuyas principales aportaciones se resumen en la Tabla 1.3. La Asociación

Interprofesional del Cerdo Ibérico (ASICI), aunque no ha contado con el apoyo de todos sus miembros, también presentó una propuesta al Ministerio muy similar a los puntos planteados en la propuesta de la Junta de Castilla y León (Europaagraria, 2012). IBERAICE, que aglutina a las empresas de la Asociación Nacional de Industrias de la Carne de España que desarrollan su actividad en el sector del cerdo ibérico, representando el 95 % de total de empresas de este sector cárnico, defiende la clasificación racial actualmente vigente y apuesta por no perjudicar a ningún colectivo creando una nueva terminología en cuanto al sistema productivo de forma que proporcione una imagen exterior bastante homogénea (BESANA, 2012).

El MAGRAMA ha dado recientemente a conocer (enero 2013) un proyecto de modificación de la Norma de Calidad, tras desarrollar varios borradores y negociar con el sector, gobiernos regionales, DOP y la interprofesional, y cuyas líneas generales se basan en: modificar las condiciones de manejo y alimentación, mejorar pureza racial, reducir la carga ganadera, mejorar la trazabilidad y el control, reforzar el papel de la Mesa de Coordinación del Ibérico (pasará a llamarse Mesa de Coordinación de la Norma de Calidad del Ibérico) y restringir la utilización de determinadas menciones, logotipos e imágenes que puedan confundir al consumidor (Infocalidad, 2013). La Tabla 1.3 detalla los principales aspectos de este proyecto que se espera que entre en vigor el 1 de marzo de 2014. No obstante, la actual Norma de Calidad ha sido extendida hasta 2013 (BOE, 2010b), donde la Interprofesional ASICI quedó reforzada al controlar la cuota económica aplicada a cada animal sacrificado bajo la extensión de la Norma de Calidad. Esa recaudación es usada para promocionar productos ibéricos, mejorar las bases de datos productivas y de consumo del sector y desarrollar programas de investigación.

La normativa que afecta a la calidad de productos agroalimentarios también tiene su importancia para el sector del cerdo ibérico. No existe una legislación nacional que regularice la calidad diferenciada de los productos agroalimentarios, pero la Junta de Andalucía aprobó recientemente la Ley de la Calidad Agroalimentaria y Pesquera de Andalucía (BOJA, 2011), la cual puede ser un ejemplo de la situación que puede afectar en un futuro a todo el territorio nacional. Esta normativa regula la trazabilidad y los sistemas obligatorios de control de la calidad de los productos agroalimentarios, pero

Tabla 1.3. Principales propuestas realizadas por distintos actores del sector del cerdo ibérico para modificar la Norma de Calidad (BOE, 2007a).

Comunidad	Propuestas de modificación en cuanto:	
	Denominación racial	Denominación alimentación
Junta de Andalucía (Apoyado por AECERIBER y FAECA)	<i>Ibérico</i> : producto de animales cuyos progenitores sean ambos ibéricos puros inscritos en el Libro Genealógico <i>Cruzado de ibérico</i> : producto de animales que no estén dentro de la categoría anterior y provengan del cruce de hembra ibérica pura (inscrita o no) y macho reproductor ibérico (inscrita o no) o duroc o cruzado de ambos.	<i>Bellota</i> : tal como se recoge en el RD 1469/2007, pero con las siguientes modificaciones: -Periodo sacrificio: 15 diciembre a 15 de marzo -Carga ganadera: 1 cerdo/ha <i>Cebo</i> : producto de animales alimentados con pienso y que han realizado una estancia mínima en campo de 60 días previo al sacrificio. Esta se correspondería con la actual categoría de “cebo de campo” pero estableciendo una carga ganadera de 9 cerdo/ha. La producción en intensivo quedaría excluida.
Junta de Extremadura	<i>Ibérico puro</i> : tal cual está contemplado en el RD 1469/2007. <i>Ibérico</i> : tal cual está contemplado en el RD 1469/2007.	<i>Bellota</i> : tal como se recoge en el RD 1469/2007. <i>Cebo</i> : incluiría todas las otras categorías de la actual Norma de Calidad que no cumplan los requisitos de “bellota”. <i>Bellota</i> : tal como se recoge en el RD 1469/2007, pero con las siguientes modificaciones: -Carga ganadera: 0,6 cerdo/ha <i>Cebo</i> : incluiría todas las otras categorías de la actual Norma de Calidad que no cumplan los requisitos de “bellota” e implantaría como requisito para las actuales producciones intensivas que los animales tengan acceso al aire libre.
Junta de Castilla y León	<i>Ibérico puro</i> : tal cual está contemplado en el RD 1469/2007. <i>Ibérico</i> : tal cual está contemplado en el RD 1469/2007.	<i>Bellota</i> : tal como se recoge en la normativa vigente <i>Tradicional</i> : procedentes de explotaciones al aire libre con una densidad de 200 cerdos /ha. Por lo tanto, incluiría a las categorías de “recebo” y “cebo de campo”. <i>Cebo</i> : tal como se recoge en la normativa vigente
IBERAICE	<i>Ibérico puro</i> : tal cual está contemplado en el RD 1469/2007. <i>Ibérico</i> : tal cual está contemplado en el RD 1469/2007.	<i>Bellota</i> : tal como se recoge en la normativa vigente <i>Tradicional</i> : procedentes de explotaciones al aire libre con una densidad de 200 cerdos /ha. Por lo tanto, incluiría a las categorías de “recebo” y “cebo de campo”. <i>Cebo</i> : tal como se recoge en la normativa vigente

Fuente: Elaboración propia

Tabla 1.3. Principales propuestas realizadas por distintos actores del sector del cerdo ibérico para modificar la Norma de Calidad (BOE, 2007a) (continuación).

Comunidad	Propuestas de modificación en cuanto:	
	Denominación racial	Denominación alimentación
MAGRAMA*	Todos los reproductores deben estar inscritos en el libro genealógico de su raza (ibérico o duroc).	<p><i>de bellota</i>: animales que se engordaran en parcelas y recintos identificados en el sistema de Información Geográfica de Parcelas Agrícolas (SIGPAC) como aptos para su utilización ara el engor de animales en montanera. Otras modificaciones son:</p> <ul style="list-style-type: none"> -Periodo sacrificio: 15 diciembre a 31 de marzo. -Carga ganadera: 0,25 – 1,25 cerdo/ha en función de la superficie arbolada cubierta por especies quercíneas. -Pesos mínimos indiidual de 115 kg/canal, excepto 100 % ibéricos que son 108 kg/canal.
	100 % <i>ibérico</i> : ambos progenitores están registrarlos en el libro genealógico de la raza de cerdo ibérico.	<p><i>de cebo de campo</i>: animales criados en explotaciones extensivas reguladas por las normas básicas de ordenación de las explotaciones de ganado porcino extensivo que han sido alimentados con piensos aunque hayan podido aprovechar recursos naturales de la dehesa o del campo. Otras modificaciones son:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Edad mínima de sacrificio: 12 meses. - Peso mínimo indiidual de 115 kg/canal. <p>Por lo tanto, incluye a las categorías “recebo” y “cebo de Campo” del RD 1469/2007.</p>
	<i>Ibérico</i> : al menos 50 % procedentes de cerdo ibérico (madre) y el otro 50 % de duroc (padre). En la etiqueta deberá incluirse con mención obligatoria el % genético de raza ibérica.	<p><i>de cebo</i>: animales alimentados con piensos cuyo manejo se realice en sistemas de explotación intensiva y si tienen un peso vivo superior a 110 kilos deben disponer de una superficie mínima de suelo libre total por animal de 2 m² en su fase de cebo. Otra modificación es:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Peso mínimo indiidual de 115 kg/canal.

*Último proyecto presentado por el MAGRAMA por el que se quiere modificar y aprobar una nueva norma de calidad para la carne, el jamón, la paleta y la caña de lomo ibéricos a fecha 30 febrero 2013.

Fuente: Elaboración propia

también hace referencia a las denominaciones de calidad diferenciada y etiquetado voluntario. Esto tiene su efecto en el sector del cerdo ibérico, pero especialmente para los productos comercializados bajo Denominación de Origen Protegida (DOP) o con otro distintivo de marca de calidad.

En España, alrededor de 451 mataderos están autorizados por la Unión Europea para sacrificar porcino (AESAN, 2012), de los cuales 53 de ellos realizan su actividad en relación al cerdo ibérico (Figura 1.3). No obstante, el número de empresas de transformación de productos ibéricos es mucho mayor. Hay cuatro DOPs de productos ibéricos con alrededor de 230 industrias asociadas (Figura

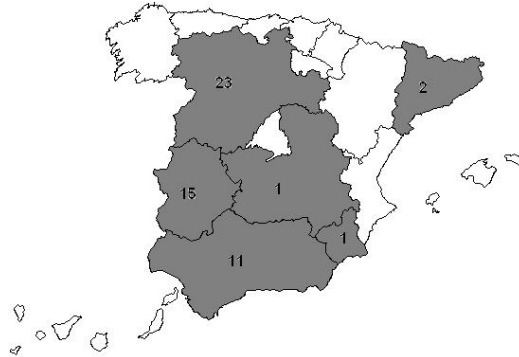


Figura 1.3. Número de mataderos vinculados al sector del porcino Ibérico por comunidad autónoma.

Fuente: ASICI.

1.4). Según datos de IBERAICE, en el conjunto del territorio nacional existen alrededor de 360 industrias (AEA, 2011). El mapa industrial de empresas de CI muestra una estructura muy atomizada, donde un 75,3 % del mercado pertenece a pequeñas empresas que venden entre 8 y 2 millones de euros. Siete empresas copan el 24,7 % del mercado restante, facturando entre 56-53 millones de euros (Sánchez Romero Carvajal-Jabugo S.A. o Chacinas de Candelario S.L.), 35-20 millones de euros (Grupo Joselito, Campofrío Alimentación S.A., Julián Martín S.A. o Mafresa El Ibérico de Confianza S.A.) o 12-9 millones de euros (Juan Manuel Hernández S.A. o COVAP S.C.A.), aproximadamente (Alimarket, 2002).



Figura 1.4. Denominaciones de origen protegidas españolas de productos de cerdo ibérico. *Número de industrias del CI cárnicas asociadas a cada DOP.

Dadas las características peculiares del sistema productivo del porcino ibérico, la mayoría de la producción/sacrificio se concentra a finales de diciembre hasta mayo (“bellota” y “recebo”); mientras los animales de “cebo”

y “cebo de campo” son sacrificados durante todo el año. La Figura 1.5 muestra el número de piezas por cada tipología de producto según categoría de régimen alimenticio de los cerca de 14 millones de piezas comercializadas en 2011 bajo Norma de Calidad. Se observa la relevancia de los productos de “cebo” y “bellota” en consonancia con el número de animales sacrificados (Figura 1.1).

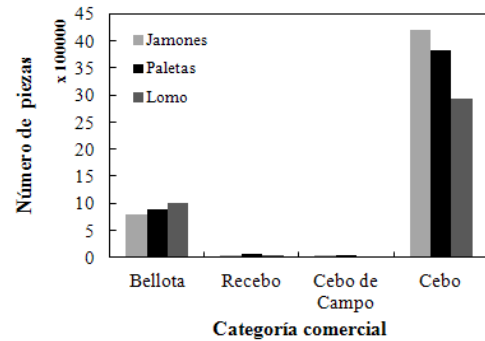


Figura 1.5. Número de piezas comercializadas de distinto régimen alimenticio bajo Norma de Calidad en 2011 (MAGRAMA, 2012b).

El consumo de productos ibéricos (jamón y paleta curada, lomo y chorizo) es también muy estacional.

Alrededor de un tercio del total consumido tiene lugar en diciembre, especialmente el jamón curado (ASICI, 2012b). La mayoría del consumo del Canal Hogares se realiza por compra directa en la industrias de transformación, en tiendas gourmet o como regalos (cestas de navidad o regalos corporativos). No obstante, en los últimos años la venta de jamón ibérico loncheado está incrementándose en los supermercados y tiendas minoristas de este canal. En la Figura 1.6, se puede observar la tendencia de consumo medio anual del Canal Hogares de los productos ibéricos regulados por la Norma de Calidad en los últimos 4 años. En 2011, el volumen (línea sólida) de productos derivados del cerdo ibérico consumidos en el Canal Hogares por tipología de producto fue de un 54,4 % jamón curado (20,85 millones de kg), 16,45 % de paletas (6,3 millones de kg), 8,86 % de lomo curado (3,39 millones de kg) y 20,23 % de chorizo (7,75 millones de kg), lo cual supone alrededor de 710 millones de euros en el mercado (ASICI, 2012b). También se muestra el valor (línea punteada) que dichos productos alcanzaron en el mercado. El jamón ibérico es claramente el producto que mayor consumo tiene y también el que mayor valor produce globalmente. El chorizo ibérico es el segundo producto que mayor consumo tiene seguido de las paletas, aunque son éstas las que alcanzan mayor valor económico. El lomo ibérico, aunque es el que menor volumen consumido tiene, alcanza un valor económico similar al del chorizo ibérico en el Canal Hogares.

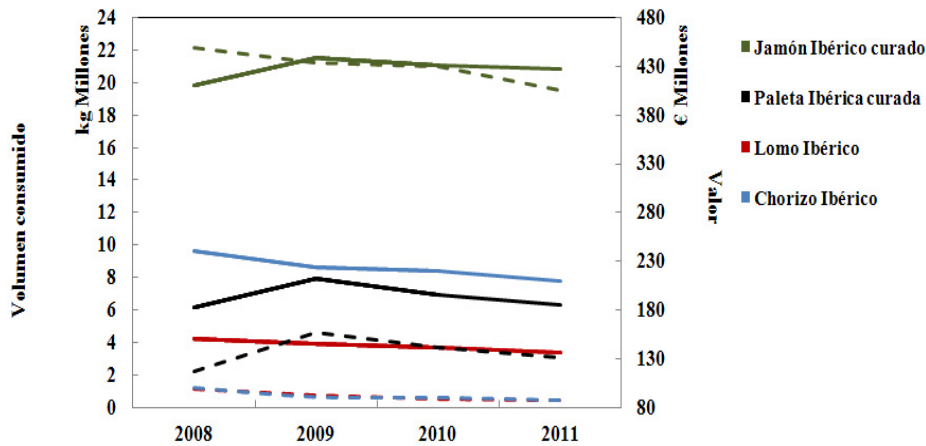


Figura 1.6. Volumen consumido (línea sólida) y valor alcanzado en el mercado (línea punteada) de productos derivados del CI derivados en el Canal Hogares durante 2008-2011 (ASICI, 2012b).

Esta misma figura permite analizar la tendencia, tanto del consumo como del valor alcanzado en el Canal Hogares durante estos últimos 4 años afectados por la crisis económica y financiera. Aunque en 2009 hubo un repunte en cuanto al consumo, mayoritariamente referido a jamones y paletas ibéricas, la tendencia general desde entonces ha sido ligeramente decreciente (sobre todo para las paletas). De hecho, en cuanto al caso concreto del producto derivado más importante, el jamón ibérico curado, aunque el consumo parece que se estabilizó entre 2010 y 2011, el valor en el Canal Hogares disminuyó, dada la caída de los precios de este producto (Figura 1.7). No obstante, esa caída en precios registrada para el jamón ibérico curado ha sido la excepción a la tendencia general que los precios medios de los productos derivados del cerdo ibérico han tenido en los últimos años en el Canal Hogares (Figura 1.7), a pesar de la crisis económica y financiera. En el año 2011, el precio medio de los productos ibéricos fue de 19,3 €/kg, aunque varía según producto y forma de presentación (ejemplo: jamón entero: 14,43 €/kg; jamón loncheado: 36,27 €/kg; paleta entera: 12,8 €/kg; paleta loncheado: 36,34€/kg).

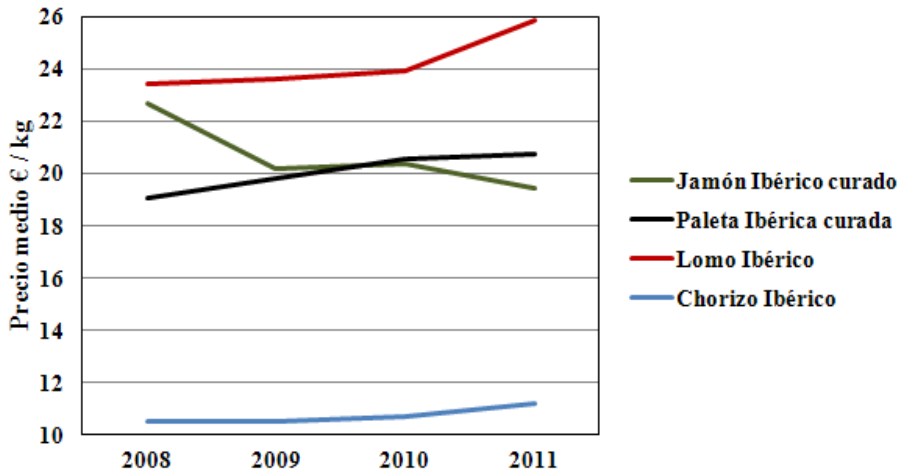


Figura 1.7. Precio medio de distintos productos de porcino ibérico durante 2008-2011 en el Canal Hogares (ASICI, 2012b).

Estos datos del Canal Hogares proporcionan una idea de la relevancia económica del sector del porcino ibérico, aunque tiene un peso aún relativamente modesto en comparación con el conjunto de productos cárnicos. Además, este canal tiene una alta cuota de mercado para este sector, especialmente para los productos derivados de la categoría “bellota” dado que son menos comunes en los otros canales de consumo. No obstante, ésta es una visión parcial del sector ya que las exportaciones tienen su relevancia, aunque no hay muchos datos fidedignos disponibles sobre este aspecto. Un informe realizado por la Agencia de Defensa de la Competencia de Andalucía (AEA, 2011) indica que la mayor parte de la carne de cerdo exportada se hace fresca o refrigerada, si bien la carne congelada ha tenido un repunte en los últimos años. No obstante, en cuanto al sector del cerdo ibérico destacan las exportaciones de jamones ibéricos, que representan entorno al 10 % del volumen total de exportaciones de jamones realizadas desde España, con un valor aproximado de 4.847 miles de euros y en actual expansión (AEA, 2011). Estados Unidos, Japón y China son los principales destinos para las exportaciones de CI españolas.

Es también importante tener una idea de los precios que las distintas categorías comerciales, según régimen alimenticio establecidas por la Norma de Calidad, pueden alcanzar en el mercado. La Figura 1.8 muestra los precios que los productos (jamón, paleta y lomo) no procesados pueden alcanzar en las lonjas de ganado españolas y los precios que pueden alcanzar una vez elaborados (jamón curado o carne fresca) en grandes superficies. Un jamón ibérico curado de “bellota” puede valer casi 5 veces más que ese mismo jamón fresco, dado que deben pasar al menos 2 años para salir al mercado. En cuanto al régimen alimenticio, un jamón ibérico curado de “bellota” puede valer el doble que uno de “cebo”, pero este puede valer un 1,5 más que uno procedente de cerdo blanco. No obstante, las cotizaciones percibidas por el ganadero al

sacrificio han ido en descenso desde 2009, junto con una clara convergencia o disminución de las diferencias entre precios para las distintas categorías comerciales de animales ibéricos (AEA, 2011). No obstante, en la actual campaña 2012-2013 las cotizaciones medias alcanzadas en las lonjas en los primeros meses de la campaña han subido a niveles de 2010 (comienzo de la crisis) lo que indica el efecto positivo que ha tenido el ajuste de la cabaña que ha venido realizando el sector desde 2009.

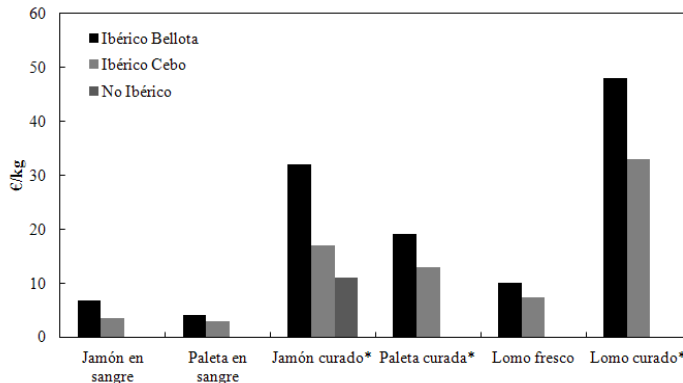


Figura 1.8. Precios medios alcanzados en la campaña 2011-2012 en la lonja de ganado de Salamanca para productos no procesados y de productos curados en “El Corte Inglés”* en noviembre 2012.

La carne fresca ibérica también tiene su importancia económica. Del total de carne consumida en el Canal Hogares, un 21 % corresponde a carne porcina. En 2010, en torno a 300 gramos por persona/año eran consumidos de carne de cerdo ibérico, aunque en los últimos años se observa un retroceso en el consumo propiciado por la actual crisis económica (AEA, 2011). De hecho, en el Canal Hogares, estos productos están mejor valorados y reconocidos que hace unos años. Esta no es la situación en el Canal Horeca, donde la carne fresca ibérica ha sido siempre y es considerada como un producto de delicatessen.

Un aspecto a destacar del consumo de carne fresca ibérica, así como de otros productos derivados del cerdo ibérico, es que los consumidores en un 40 % de los casos encuentran confuso el etiquetado de los productos y cerca de la mitad de ellos no conocen los sellos o marca de calidad como DOP (MAGRAMA, 2009). De hecho, los consumidores encuestados en un reciente estudio de la Agencia de Defensa de la Competencia de Andalucía indicaron que no reconocen las características propias de cada producto derivado del cerdo ibérico según la clasificación comercial establecida en la actual normativa de calidad vigente (AEA, 2011). Esto pone de relieve la necesidad de encauzar esfuerzos para mejorar no sólo los controles de calidad en este sector sino también la transmisión de la información al consumidor.

Hay que tener en cuenta que los consumidores, especialmente en países desarrollados, están concienciados no sólo sobre la seguridad alimentaria y el impacto medioambiental de los productos agroalimentarios, sino también por su calidad en términos de salud, nutrición y calidad sensorial. Grunet et al. (2000) han identificado cuatro características principales que los consumidores consideran para evaluar la calidad de los productos agroalimentarios: características sensoriales, propiedades saludables y nutritivas, comodidad del modo de preparación y sistema productivo/elaboración (incluso si no afecta a la calidad). Esto es muy importante para el sector productivo tradicional del cerdo ibérico. La sociedad está dispuesta a pagar por calidad productos cárnicos controlados por métodos validados, siempre que esa información esté reflejada en el etiquetado (Mørkbak et al., 2010). Por ejemplo, Dransfield et al. (2005) indicaron que los consumidores están dispuestos a pagar un incremento medio de un 5 % por productos procedentes de cerdos alimentados en extensivo, si bien un quinto de los encuestados declararon que estarían dispuestos a pagar un 20 % extra. Sin embargo, la actitud ciudadana y el comportamiento del consumidor pueden ser diferentes (Verbeke et al., 2010).

Por todas estas razones, se hace imprescindible la existencia de sistemas objetivos y fiables que permitan controlar la calidad de los productos derivados del cerdo ibérico.

3.2. Métodos analíticos utilizados en el control de calidad de productos de cerdo ibérico

Existe una gran variabilidad de sistemas de producción ganadera con especificaciones claramente establecidas que afectan a la calidad de los productos cárnicos derivados, pero que también tienen su importancia social en el área de producción, en el bienestar de los animales, en el valor nutricional de los productos, etc. Sistemas productivos tradicionales, como el caso de la crianza de cerdo ibérico, dan lugar a productos cárnicos de alto valor añadido, vendidos y muy apreciados por todo el mundo, aunque en algunos casos no haya sistemas de control de calidad estandarizados, bien establecidos y no subjetivos.

Diversos estudios han mostrado que la composición en ácidos grasos, vitaminas o minerales en el tejido adiposo o músculo porcino depende de la composición de la dieta ingerida por el animal, ya que estos son monogástricos (Rosenvold y Andersen, 2003; Wood et al., 2008). Esto significa que la composición de los tejidos biológicos es fiel reflejo de los alimentos metabolizados. En el caso del cerdo ibérico, a medida que aumenta el consumo de bellotas, pastos y otros recursos naturales disponibles en la dehesa (ricos en ácidos grasos insaturados) durante la fase de engorde en extensivo (montanera), mayor será la fracción de ácidos grasos insaturados frente a saturados y mejores atributos sensoriales tendrá el producto cárnico (Casillas, 1994; Cava et al., 2000; Andrés et al., 2004; Muriel et al., 2004; Petrón et al., 2004a; Ventanas et al., 2007a; Tejerina et al., 2012a). Estos productos, muy apreciados por los consumidores, tendrán, por tanto, distintas calidades en función de las características productivas, tal y como se recoge en el BOE (2007a), lo que conlleva a que alcancen distintos precios tanto en el mercado español como internacional (ranking según precio: “bellota” > “receso” > “cebo de campo” > “cebo”). Además, en las últimas décadas, los consumidores consideran más palatables, nutritivos y seguros aquellos productos cárnicos procedentes de sistemas productivos extensivos tradicionales que aquellos producidos en intensivo (Dransfiel et al., 2005), aunque realmente tengan poco efecto en la calidad de la carne (Bonneau y Lebret, 2010). No obstante, la producción en extensivo sí tiene un impacto en la respuesta inmunológica de los animales frente a patógenos o enfermedades dado que este sistema productivo (especialmente en cuestiones de alojamiento y manejo) tienen un efecto favorable (García-Torres et al., 2011). Esta percepción proporciona una etiqueta de producto “sostenible y natural” a los derivados del cerdo ibérico que valoran más los consumidores, y de la que se aprovechan otros productos ibéricos producidos en intensivo o de forma no vinculada a la dehesa. De hecho, las explotaciones extensivas que producen cerdos ibéricos son más rentables que otras explotaciones en extensivo de la dehesa basadas en otras especies domésticas, debido en gran parte al buen

nicho de mercado que tienen los productos derivados de cerdo ibérico (Gaspar et al., 2008, 2009). Sin embargo, debido a la actual crisis económica y financiera, la rentabilidad del sector ha disminuido desde hace algunos años atrás. Como se ha indicado en la sección 3.1, en los últimos años, los precios pagados al sacrificio para cada categoría comercial han ido descendiendo y convergiendo entre ellas (AEA, 2011). Esto se traduce en reducciones de los márgenes de beneficio para el ganadero y en una posición bastante difícil, principalmente para los que se basan en una producción tradicional en la dehesa de cerdos ibéricos puros, que conlleva mayores costes productivos que otros sistemas de explotación. No obstante, estas explotaciones siguen manteniendo su contribución en la socioeconomía regional, garantizando la continuidad y supervivencia de este ecosistema complejo, particular y dinámico.

El sistema de control oficial vigente para certificar el régimen alimenticio de los animales se basa en la inspección visual de los animales en las explotaciones por parte de inspectores autorizados por ISO/IEC 17020. Anteriormente, el método vigente era la determinación del perfil de ácidos grasos de muestras de grasa subcutánea fundidas por Cromatografía de Gases (GC, denominada en inglés *Gas Chromatography*) (BOE, 2007a). El método actual es de alto coste y requiere de personal técnico cualificado, pudiéndose además considerar como subjetivo ya que se basa en una inspección visual. El análisis GC también implica un alto coste, consume tiempo y reactivos. Además, sólo proporciona información por lotes de animales, ya que debido a sus limitaciones de precio y tiempo de análisis, sólo se realiza sobre muestras medias resultantes de fundir muestras individuales de un grupo/lote de animales. En los últimos años, han aparecido “piensos especiales” enriquecidos con ácidos grasos (principalmente oleico), vitaminas, antioxidantes y/o bacterias probióticas, con el objetivo de que los animales alcancen un perfil de ácidos grasos o calidad sensorial similar a los obtenidos en extensivo sin que los animales entren en montanera (Daza et al., 2005b; Ventanas et al., 2007b; Jurado et al., 2008; Parra et al., 2010). Este tipo de racionamiento se denominará en esta tesis doctoral de aquí en adelante como “piensos alto oleico”.

Desde la década de los ochenta, distintos grupos de investigación han evaluado diferentes métodos analíticos para autenticar productos derivados del cerdo ibérico según su régimen alimenticio, mediante la determinación y caracterización de parámetros específicos y diferenciadores entre categorías. El principal objetivo de esta revisión es plasmar las distintas aproximaciones investigadas hasta la fecha para clasificar y caracterizar productos del CI según su régimen alimenticio, así como discutir las características principales de cada una de ellas. Este enfoque se debe a que el régimen alimenticio es el aspecto principal y específico del sector del CI, distinto del control analítico

tradicional utilizado para controlar otros parámetros de calidad en productos cárnicos porcinos.

3.2.1. Métodos analíticos tradicionales

Se han definido como métodos analíticos tradicionales aquellos que a lo largo de los años fueron, han sido o están siendo utilizados como sistema de autentificación de productos derivados del CI en función del régimen alimenticio durante el periodo de montanera. Algunos casos se han contemplado legalmente en la normativa española.

3.2.1.1. Métodos basados en el comportamiento de la grasa

Estos métodos se basan en el hecho de que los animales de “bellota” presentan un mayor porcentaje de ácidos grasos insaturados, como oleico o linoleico, que los animales de “cebo”, debido al efecto que el régimen alimenticio tiene en la composición grasa (Flores et al., 1988; Petrón et al., 2004a; Pérez-Palacios et al., 2009). Esta distinta composición adiposa tiene su repercusión en el comportamiento de la grasa: sensación táctil, punto de fusión e índice de yodo, entre otras características.

Una baja consistencia y blandura de la grasa subcutánea se asocia a mayores porcentajes de ácidos grasos insaturados (Ellis y Isbell, 1926; Wood, 1984). Esto significa que los productos de “bellota” son considerados como los que presentan una sensación táctil más suave y blanda; por otra parte, si hay una alta concentración de ácidos grasos saturados (animales alimentados con piensos compuestos, “cebo”), la **sensación táctil** de la grasa es más dura. Hoy en día, esta técnica no destructiva y simple es usada principalmente por los vendedores y consumidores para tener una información aproximada del producto. Sin embargo, la relación existente entre la consistencia de la grasa subcutánea y la composición en ácidos grasos es mucho más compleja dadas las interacciones entre ácidos grasos y otros compuestos (López-Bote et al., 2002); además, si se tienen en cuenta las nuevas materias primas utilizadas en el racionamiento de gran riqueza oleaginosa, la sensación táctil es un método subjetivo no muy fiable.

El **punto de fusión**, temperatura a la cual la grasa se funde, también ha sido evaluado como técnica de clasificación de productos derivados del cerdo ibérico (Flores et al., 1988), incluso fue un método de control de calidad oficial en la campaña 1988-1989 (BOE, 1988). Esta temperatura depende de la composición grasa, ya que cada ácido graso tiene un punto de fusión específico y propio (Bockisch, 1998). Existen distintas metodologías para determinar este parámetro; no obstante, el procedimiento más simple y extendido para la determinación del punto de fusión es el método de tubos capilares según el método oficial nº 920.157 de la Asociación Oficial de Química Analítica (AOAC, *Association of Official Analytical Chemists*) (1990). Cuanto mayor es la presencia de ácidos grasos insaturados (dobles

enlaces) frente a los saturados, menores puntos de fusión se obtienen (López-Bote et al., 2002).

El **índice de yodo**, determinado por el método Wijs según el método oficial nº 28.023 de AOAC (1984), es una técnica rápida para determinar el nivel de moléculas insaturadas presentes en un producto. Este parámetro también se ha evaluado para discriminar productos del CI según la calidad. Se puede decir que el índice de yodo es mayor cuanto mayor es la cantidad de enlaces dobles presentes en la grasa. Esto se traduce en que productos derivados de cerdos de “bellota” tienen mayor índice de yodo que los obtenidos a partir de animales alimentados con otras estrategias de racionamiento (Flores et al., 1988). La Tabla 2.1 recoge una revisión de la literatura más relevante publicada en relación a estos métodos analíticos mostrando los principales resultados alcanzados en cada una de ellas.

En resumen, considerando los avances actuales en racionamiento y las nuevas materias primas empleadas para simular las características de los productos del CI como si hubieran sido engordados en montanera, estos métodos no proporcionan información fiable para ser considerados como métodos analíticos aceptables.

Tabla 2.1. Estudios realizados en base al comportamiento graso de muestras de cerdo ibérico según régimen alimenticio.

Artículo	Muestra	Parámetro	Resultado principal
Flores et al., 1988	Grasa subcutánea de jamón	Punto de fusión (°C)	Valor medio: 39,64 °C (B) 44,54 °C (C) 44,82°C (R)
		Índice de yodo (g I ₂ /100g)	68,11 g I ₂ /100g (B) 56,18 g I ₂ /100g (C) 58,64 g I ₂ /100g (R)
Daza et al., 2009	Grasa subcutánea	Punto de fusión (°C)	No encontró diferencia estadísticamente significativa entre B y PAO
Soto et al., 2009	Lomo curado	Índice de yodo (g I ₂ /100g)	66,5 ± 3,2 g I ₂ /100g (B) 65,1 ± 0,9 g I ₂ /100g (PAO)

B: “bellota”; C: “cebo”; R: “recebo”; PAO: “pienso alto oleico”.

Fuente: Elaboración propia

3.2.1.2. Determinación del perfil de ácidos grasos por cromatografía de gases

El análisis del **perfil de ácidos grasos por GC** era el método oficial regulado por la Norma de Calidad del sector CI hasta la primera campaña tras la entrada en vigor de la actual Norma de Calidad (BOE, 2007a) para clasificar

productos ibéricos según régimen alimenticio. La anterior Norma de Calidad establecía el procedimiento de muestreo (BOE, 2004) y los valores límites de los cuatro principales ácidos grasos que deben ser determinados en grasa subcutánea (ácido oleico o C18:1, esteárico o C18:0, linoleico o C18:2 y palmítico o C16:0) para clasificar animales en los distintos regímenes alimenticios (BOE, 2007b).

La metodología para determinar la composición de ácidos grasos (porcentaje en peso) se basa en la separación y cuantificación de los metil ésteres de los ácidos grasos con 8-24 átomos de carbono procedentes de los triglicéridos y fosfolípidos de la grasa (AOAC, 1999). El procedimiento requiere que la grasa una vez fundida en microondas o saponificada con disolventes orgánicos se mezcle con hexano y después sea decantada para que una alícuota de la fase orgánica sea analizada por GC, por lo que sigue siendo un análisis lento que debe realizarse en condiciones muy controladas. Además, el análisis GC es una técnica más limitada para fines cuantitativos que otras técnicas analíticas ya que requiere de referencias normalizadas para identificar cualitativamente un componente y así poder determinar la altura o área asociada en el cromatograma para la información cuantitativa. No obstante, es cierto que el análisis del perfil lipídico por GC es muy adecuado en términos de repetitividad y reproducibilidad entre laboratorios (García-Olmo et al., 2002).

Las razones para usar esta metodología como técnica de clasificación por calidad en el sector del CI procedían de los resultados obtenidos por varios autores del análisis del perfil de ácidos grasos del tejido subcutáneo de animales asociados a distintos regímenes alimenticios (Flores et al., 1988; Cava et al., 1997; Ruiz et al., 1998; Tejerina et al. 2012a). El perfil lipídico de “bellota” en muestras de grasa de jamones es muy diferente al correspondiente a muestras de “recebo” o “cebo” (para todos los ácidos grasos tanto minoritarios como mayoritarios), mientras que entre estas dos categorías sólo se observaron diferencias significativas en determinados ácidos grasos (palmítico, linoleico y oleico) (Flores et al., 1988). Ruiz et al. (1998), por su parte, indicaron que la zona de muestreo seleccionada puede influir en los resultados dado que la grasa acumulada en el músculo, y especialmente en el hígado, reflejan la ingestión de alimentos en el último periodo (semanas) de engorde, mientras las muestras de tejido adiposo subcutáneo reflejan periodos más largos de engorde (meses). Por eso, la determinación del perfil de ácidos grasos en muestras de grasa subcutánea está más directamente relacionada con la alimentación y sistema productivo que los animales han tenido durante al menos los dos últimos meses de engorde previos al sacrificio (Ruiz y Petró, 2000). Hay que tener en cuenta, especialmente en el análisis de músculos, que la región anatómica seleccionada también puede influir en la determinación del perfil de ácidos grasos, el cual podría resultar diferente para una misma muestra (Narváez-Rivas et al., 2009).

Otro aspecto a tener en cuenta es el uso generalizado que, hoy en día, se realiza de nuevas materias primas y piensos enriquecidos en ácidos grasos monoinsaturados que imitan el perfil de ácidos grasos de animales que se han alimentado con bellotas y pastos. Este fenómeno plantea a algunos autores interrogantes sobre si esta técnica analítica es adecuada (Rey et al., 2006; Delgado-Huertas et al., 2007; Pérez-Palacios et al., 2009).

Todo este panorama indica que la determinación de los cuatro ácidos grasos principales mediante GC es útil para clasificar productos de CI en las distintas categorías comerciales cuando sólo se usan piensos tradicionales en el racionamiento. Además, cada año el perfil de ácidos grasos se ve afectado por diversos factores, como las condiciones agroclimáticas por su repercusión en la composición de las bellotas y pastos (Tejerina et al., 2011, 2012b) o los recursos naturales disponibles en la dehesa (Narváez-Rivas et al., 2009). Esto se refleja en el hecho de que durante varias campañas, el contrato tipo homologado estableció diferentes niveles según la campaña para cada uno de los cuatro ácidos grasos regulados. Una alternativa que algunos autores han planteado para continuar utilizando esta metodología y técnica es la de aplicar un análisis multivariante a todo el perfil de ácidos grasos en lugar de establecer unos niveles de corte para los cuatro principales, de modo que se tuvieran en cuenta todas las diferencias existentes entre regímenes (De Pedro, 2001). Además, diversos factores como el genotipo (Petrón et al., 2004a). El periodo de montanera (Carraspiso et al., 2007) también tienen su efecto, aunque limitado, en la composición de ácidos grasos, aunque es más relevante el efecto del sistema productivo (extensivo o intensivo) o la alimentación (recursos naturales de la dehesa o piensos compuestos).

3.2.2. Métodos analíticos no tradicionales

3.2.2.1. Determinación de antioxidantes (α - y γ - tocoferoles) por métodos cromatográficos

Los recursos naturales disponibles en la dehesa (principalmente bellotas y pasto) son fuentes de antioxidantes como tocoferoles, que se depositan en el tejido graso y muscular (Rey et al., 2006, 2010; Tejerina et al. 2012a) sin sufrir grandes alteraciones durante la digestión o metabolismo. Mientras las bellotas tienen un alto contenido en γ -tocoferol, el pasto tiene mayores concentraciones de α -tocoferol (Isabel et al., 2009; Tejerina et al. 2012a). No obstante, la concentración de estos antioxidantes en los tejidos depende de distintas variables como la variabilidad agro-climática, las especies herbáceas predominantes o la edad de las plantas. Se supone que los animales de “bellota” se han alimentado en extensivo en la dehesa y presentarán en sus productos derivados mayores concentraciones de tocoferoles que los de “cebo”.

López-Bote y Rey (1998) desarrollaron una metodología para determinar el contenido de α - y γ - tocoferoles (presentes en la fracción insaponificable

lipídica de los tejidos, aunque en concentraciones muy pequeñas: $\mu\text{g/g}$ o ppm). El análisis se basa en la saponificación del tejido biológico y la extracción de los tocoferoles con hexano; posteriormente la capa superior es evaporada y se disuelve previamente en etanol por Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC, *High-Performance Liquid Chromatography*) de fase reversa. La identificación y cuantificación se realiza por GC, por lo que requiere de estándares de referencia. Todo este procedimiento hace que este análisis sea complejo y lento. Además, requiere de equipamiento sofisticado para trabajar a altas temperaturas, así como de reactivos, genera residuos nocivos y necesita de personal técnico cualificado.

Algunas investigaciones indican que la acumulación de tocoferoles está sólo influenciada por la ingesta de ciertos alimentos y no por el sistema productivo (extensivo o confinamiento). Esto se debe a que los animales confinados que fueron alimentados con un pienso suplementado con vitamina E (α -tocoferil-acetato), así como los que se alimentaron en extensivo con “piensos alto oleico” más pasto, no mostraron diferencias significativas en valores de α -tocoferol con referencia a animales alimentados con bellota y pasto, aunque esa observación no se encontró para el contenido de γ -tocoferol (Rey et al., 2006; Isabel et al., 2009; Pérez-Palacios et al. 2009). Estos hechos ponen de manifiesto la controversia que puede ocurrir al usar el parámetro α -tocoferol para discriminar entre regímenes alimenticios, ya que las dietas de los animales pueden incluir α -tocoferil-acetato u otra suplementación vitamínica-mineral para imitar la calidad obtenida por los cerdos alimentados en montanera. Dicho esto, el parámetro γ -tocoferol es el más útil para discriminar productos de CI según régimen alimenticio, ya que está más relacionado con la ingesta de bellota que de otros ingredientes. No obstante, hay que tener presente que la investigación con nuevas materias primas que tengan un alto contenido en γ -tocoferol puede generar la misma problemática que con la suplementación con α -tocoferol.

Una alternativa para resolver estas circunstancias es la de identificar formas naturales de tocoferoles. Rey et al. (2010) evaluaron la distribución de formas naturales estereoisoméricas de α -tocoferol en músculo (*biceps femoris*), concluyendo que estos parámetros son más útiles para discriminar entre categorías y evitar la problemática de la suplementación artificial con determinados compuestos para aumentar la concentración de tocoferoles y otros antioxidantes. Hay que tener en cuenta que éste es un análisis más complejo que el tradicionalmente usado, mencionado anteriormente. Otros factores pueden tener también su influencia en la determinación/cuantificación de estos componentes: la zona anatómica de toma de muestra (Rey et al., 2010; Tejerina et al., 2012a y 2012b), variabilidad anual de los recursos disponibles en montanera y el tiempo de conservación o curación (Rey et al., 2006 y 2010; Isabel et al., 2009).

En general, se puede apreciar, según la literatura revisada, que el parámetro γ -tocoferol es más útil para discriminar productos de CI de distinto régimen alimenticio (“bellota” frente a “Pienso”, incluso frente a “pienso alto oleico”), ya que no se ve afectado por una suplementación vitamínica o mineral en la dieta. Hay que tener en cuenta que animales en intensivo (por lo tanto al no entrar en montanera no pueden ser considerados como “bellota”) que sí son alimentados con bellotas y pastos, pueden ser erróneamente clasificados como “bellota”, por lo que la determinación de estos compuestos indicaría la dieta que ha tenido el animal más que el sistema productivo en el que se ha criado. De cualquier forma es cierto que, en la práctica, debido a los costes económicos que supondría, no se realiza la alimentación de animales de rejilla con bellota y pasto. Además, en la literatura no existen valores límites de α - o γ -tocoferol publicados para clasificar animales en una categoría y otra.

3.2.2.2. *Compuestos volátiles por métodos cromatográficos*

Las reacciones enzimáticas de lípidos y proteínas generan diversos **compuestos volátiles** como aldehídos, cetonas, hidrocarburos alifáticos, hidrocarburos aromáticos, alcoholes, ácidos carboxílicos, ésteres, éteres, lactonas y compuestos nitrogenados que pueden ser identificados y cuantificados por métodos cromatográficos (García et al., 1991; López et al., 1992; Timón et al., 1998; Narváez-Rivas et al., 2010a, 2010b, 2012).

La metodología seguida en este ámbito se basa, en general, en una técnica combinada de Cromatografía de Gases y Espectrometría de Masas (GC-MS, *Gas Chromatography-Mass Spectrometry*), aunque en algunas etapas como las de insolación o identificación se pueden usar otras técnicas alternativas (como HPLC), tal y como describe Narváez-Rivas et al. (2012). La metodología tradicional se basa en triturar la muestra y luego purgarla durante 15-30 minutos; posteriormente los compuestos volátiles generados son transportados por un gas para ser separados individualmente por GC. Una vez que los compuestos presentes en la fracción volátil son separados se identifican por su relación masa-carga en el espectrofotómetro de masas (MS). Este método, al igual que otras técnicas cromatográficas, es un método que necesita de estándares normalizados para proceder a la identificación y cuantificación de los compuestos. Además, al ser un análisis GC esta metodología presenta las mismas limitaciones que las descritas en los apartados anteriores.

Un trabajo reciente revisa tanto la metodología utilizada para el análisis de volátiles en jamones ibéricos frescos y curados como los principales estudios realizados para caracterizar el perfil de volátiles de estos productos (Narváez-Rivas et al., 2012). En general, el perfil de compuestos volátiles se puede ver afectado por diversos factores como el genotipo, sexo y edad de los animales, las especies utilizadas en la elaboración/curación de los productos (Ramírez y Cava, 2007c) o el régimen alimenticio (López-Bote et al., 1992; Carraspiño et al., 2003a, 2003b; Narváez-Rivas et al., 2010b; Narváez-Rivas et al., 2011).

No obstante, las diferencias encontradas en cuanto a los compuestos volátiles han sido cuantitativas y no cualitativas, aunque hay que tener en cuenta que según el tipo de muestra, músculo o grasa, y la metodología/instrumentación utilizada, los compuestos volátiles identificados y cuantificados son distintos (Narváez-Rivas et al., 2011, 2012).

Como se ha resaltado en el análisis de perfil de ácidos grasos y tocoferoles de productos cárnicos, la localización anatómica seleccionada para la toma de muestras puede tener su efecto también en los compuestos volátiles (Narváez-Rivas et al., 2010a). Además, si los productos que se analizan son curados, el proceso de elaboración/curación, los aditivos o el tiempo de curación pueden tener también un impacto importante en el perfil volátil (Ramírez y Cava, 2007c).

Una publicación reciente relacionada con este campo explora la determinación del perfil de compuestos volátiles orgánicos en músculo y grasa subcutánea de cerdos ibéricos de “bellota” y “pienso alto oleico” mediante un nuevo método, más rápido que el tradicional y con mejorada sensibilidad y resolución, como es la Espectrometría de Masas de Tiempo de Vuelo por Reacción de Transferencia Protónica (PTR-ToF-MS, *Proton Transfer Reaction Time of Flight Mass-Spectrometry*) (Sánchez del Pulgar et al., 2013). El uso de esta técnica, en combinación con un apropiado análisis quimiométrico de los datos, puede permitir una rápida discriminación entre animales con distintos regímenes alimenticios, aunque tenga limitaciones similares a las descritas anteriormente.

3.2.2.3. *Identificación y cuantificación de hidrocarburos lineales (n-alcano y n-alqueno) y ramificados (neofitadieno) en la fracción lipídica insaponificable*

Los **hidrocarburos lineales y ramificados** son compuestos presentes en la fracción lipídica insaponificable, representando menos del 1 % del total de la grasa, que se depositan en los tejidos tal y como son ingeridos por los animales ya que no sufren muchas modificaciones durante la digestión/metabolismo. El neofitadieno (hidrocarburo ramificado) es un compuesto presente en el pasto, pero no se encuentra en las bellotas o piensos (Tejeda et al., 2001). Por otra parte, los hidrocarburos lineales (n-alcano y n-alqueno) son compuestos presentes en los tejidos vegetales (Tejeda et al., 1999). No obstante, hay que tener presente que existen otras materias primas que contienen hidrocarburos que se pueden añadir en la dieta e incluso algunos hidrocarburos se generan debido a reacciones oxidativas de los tejidos (Tejeda et al., 2001).

La metodología empleada para determinar hidrocarburos, ya sean lineales o ramificados, es muy similar en ambos casos. Se basan en una extracción y saponificación lipídica, seguida de una extracción más específica para obtener la fracción de hidrocarburos. Finalmente, los compuestos son separados individualmente mediante un análisis GC, donde las condiciones analíticas son

similares en ambas determinaciones. Los únicos cambios que se dan en la metodología se corresponden simplemente a las referencias estándares usadas para identificar y cuantificar cada tipología de hidrocarburo. Este procedimiento fue patentado por Tejeda et al. (2005).

En general se ha observado que el neofitadieno, hidrocarburo ramificado, se localiza en muestras procedentes de animales que se han alimentado con pastos, independientemente de si han sido alimentados con piensos compuestos tradicionales, especiales o con bellota (Petrón et al., 2006; Pérez-Palacios et al., 2009). El escualeno ha sido identificado en piensos compuestos, por lo que una mayor concentración de este hidrocarburo ramificado se relaciona con animales de “cebo”; sin embargo, los estudios no han mostrado diferencias significativas de este último compuesto entre las distintas categorías comerciales de productos derivados del cerdo ibérico (Tejeda et al., 2001).

Algunos autores han puesto de relieve las limitaciones de la determinación del perfil de hidrocarburos por GC, ya que son compuestos que se encuentran en concentraciones muy pequeñas en el tejido (Viera-Alcaide et al., 2009). Según estos autores, un mejor aislamiento de la fracción insaponificable lipídica por HPLC-GC (Gamero-Pasadas et al., 2006) permitiría mejorar la identificación y cuantificación de hidrocarburos en muestras de grasa de CI. De hecho, Viera-Alcaide et al. (2009) indicaron que el perfil de hidrocarburos lineales determinados según esa nueva metodología para muestras de “bellota”, “recebo” y “cebo” resultan estadísticamente diferentes entre sí, especialmente los n-alcenos. Este aspecto no fue detectado por otros autores que usaron instrumentación GC tradicional, como se ha descrito anteriormente.

En general, el control de calidad de productos derivados del CI basados en la determinación de hidrocarburos es una técnica compleja y, aparentemente, sólo la determinación del compuesto neofitadieno puede ser de interés al relacionarse con la ingesta de pasto por parte de los animales y, por tanto, con la producción en extensivo en la dehesa. No obstante, hay que ser precavido en esta aproximación y tener en cuenta que la adición de pasto/hierba en la dieta de los animales en confinamiento puede dar lugar a un perfil en hidrocarburos similar al obtenido a partir de animales que han estado en montanera en la dehesa (aspecto que todavía no ha sido publicado en la literatura). Además, al igual que otros compuestos descritos anteriormente en esta sección, presentes en el pasto o en la bellota y que se acumulan en los tejidos biológicos tras la ingesta de éstos, la variabilidad anual en las condiciones agroclimáticas u otros factores que afecten a la dehesa, tendrán su efecto en la concentración de hidrocarburos.

3.2.2.4. Perfil de triglicéridos

Los **triglicéridos** (TG, *Triacylglycerols*) son los lípidos que presentan mayor concentración (alrededor del 86 %) en el tejido adiposo del CI (Perona et al., 2005). La metodología aplicada para determinar estos compuestos es más simple que las técnicas anteriormente descritas (como el perfil de ácidos grasos, tocoferoles o hidrocarburos), ya que no es necesario realizar operaciones previas al análisis como una saponificación o formación de los metil ésteres. No obstante, esta técnica es bastante compleja y costosa en cuestiones de tiempo de análisis; además, requiere de altas temperaturas y productos químicos al basarse en una técnica cromatográfica. HPLC es el método empleado para el análisis de estos compuestos dada la baja volatilidad de los triglicéridos (Díaz et al., 1996; Tejeda et al., 2002, Petró et al., 2004b). No obstante, los avances actuales en instrumentación GC han permitido que diversos autores hayan utilizado esta técnica para determinar el perfil de triglicéridos (Viera-Alcaide et al., 2007, 2008; Narváez-Rivas et al., 2009; Gallardo et al., 2012). Sin embargo, el análisis sigue requiriendo de altas temperaturas de trabajo y varios productos químicos, además de una estandarización del instrumento. No obstante, hay que tener en cuenta que la determinación del perfil de triglicéridos por GC es más rápida que la de otros parámetros como el perfil de ácidos grasos, hidrocarburos o compuestos volátiles, ya que los tiempos de derivación y recuperación son menores.

Diecisiete triglicéridos han sido identificados en muestras de grasa de CI (Díaz et al., 1996; Tejeda et al., 2002; Petró et al., 2004b; Viera-Alcaide et al., 2007, 2008; Narváez-Rivas et al., 2009; Gallardo et al., 2012), aunque la sensibilidad para determinar cada uno de ellos depende de la instrumentación utilizada. Algunos autores han estudiado y caracterizado el perfil TG de cerdos ibéricos con distintos regímenes alimenticios (Díaz et al., 1996; Tejeda et al., 2002; Petró et al., 2004b; Viera-Alcaide et al., 2007, 2008, 2009; Gallardo et al., 2012) y genotipos (Petró et al., 2004b; Viera-Alcaide et al., 2009) como técnica analítica para fines de autenticación. Todos los autores coinciden en que el régimen alimenticio tiene un efecto más importante respecto a la raza en el perfil TG.

En general, todos los autores en este campo han observado diferencias cuantitativas en perfiles de TG entre categorías (especialmente entre aquellas extremas); no obstante, los métodos de clasificación han mostrado tendencias relativamente discriminatorias. La Tabla 2.2 muestra una síntesis de los resultados de clasificación obtenidos por distintos autores basándose en un análisis cromatográfico tanto del perfil de triglicéridos como de otros parámetros/compuestos.

Como en el caso de otros parámetros revisados en esta sección, la zona de muestreo anatómica elegida para realizar el análisis puede tener su efecto en el perfil TG (Narváez-Rivas et al., 2009), dado que la actividad enzimática en la

lipogénesis entre distintas partes de un músculo puede ser diferente. Además, los mismos autores han encontrado que la variabilidad anual en los recursos naturales disponibles para los animales durante la montanera tiene su efecto en los resultados. Narváez-Rivas et al. (2007) también indicaron que reacciones como la hidrólisis durante el proceso de curación pueden afectar al perfil TG.

En este momento, no hay estudios que hayan demostrado el efecto que estrategias alimenticias como “pienso alto oleico” puede tener en el perfil de triglicéridos. No obstante, dado que el análisis de TG es una medida indirecta del perfil de ácidos grasos, se pueden dar limitaciones similares a este parámetro al estudiar el perfil TG en animales alimentados con piensos especiales.

Tabla 2.2. Clasificación de productos de cerdo ibérico en distintas categorías comerciales en base al análisis cromatográfico de distintos componentes.

Artículo	Muest.	Parám.	Número de muestras			Porcentaje de muestras correctamente clasificadas (%)		
			B	C	R	B	C	R
De Pedro et al., 1995 ⁺	Grasa sub.	Perfil de ácidos grasos por GC	Cal: 14 Val: 25	Cal: 25 Val: 14	Cal: 25 Val: 15	76 [^]	100 [^]	73,3 [^]
Viera-Alcaide et al., 2008	Grasa sub.	Perfil de triglicéridos por GC	652	211	697	63,3	99,5	53,9
Narváez-Rivas et al., 2010b	Grasa sub.	Perfil de volátiles por GC-MS	35	27	13	100*	100*	100*
Gallardo et al., 2012	Grasa sub.	Perfil de triglicéridos por GC	1.913	83	-	PCA mostró diferencias entre grupos. Establecieron valores límites de OOL y OLL para discriminar. “bellota” si OOL>3 % y OLL>0,4 %		
						94 (LDA)	100 (LDA)	-
						89,8 (SIMCA)	85,6 (SIMCA)	-
Jurado et al., 2013	Grasa sub.	Metilesteroles por GC-MS/GC-FDI	27	20	-	85,7 (ANN)	97,8 (ANN)	-

Muestr.: muestra; Parám.: parámetro; B: “bellota”; C: “cebo”; R: “recebo”; Cal: calibración; Val: validación.

+ Análisis multivariante basado en 11 valores de ácidos grasos como variables para clasificar.

[^]Porcentajes obtenidos por validación externa.

*Porcentaje obtenido por validación externa de los modelos realizados con el 33 % del total de muestras.

Fuente: Elaboración propia

Como se ha puesto de manifiesto, el análisis de cromatografía de gases es una de las técnicas analíticas más utilizadas para caracterizar muestras de cerdo ibérico con distintos regímenes determinando distintos

parámetros/compuestos como ácidos grasos, antioxidantes, compuestos volátiles o triglicéridos. Una reciente publicación explora la determinación por GC de otros compuestos, como algunos metilesteros ((3b,4a,5a)-4-methyl-cholesta-7-en-3-ol, (3b,4a,5a)-4-methyl-cholesta-8(14)-en-3-ol, (3b,5a)-4,4-dimethyl-cholesta-8(14), 24-dien-3-ol,(3b)-lanosta-8,24-dien-3-ol, (3b, 5a)-4, 4-dimethyl-cholesta-8, 14-dien-3-ol and (3b)-lanost-9(11), 24-dien-3-ol) para discriminar entre muestras de cerdos ibéricos de “bellota” y “cebo”, obteniendo un porcentaje de clasificación correcta media del 91,7 %, a través del uso de redes neuronales (Jurado et al., 2013). Esto pone de manifiesto que conforme la instrumentación va avanzando y las técnicas analíticas como GC se van perfeccionando y depurando, pueden identificarse nuevos compuestos y servir de utilidad para discriminar entre regímenes alimenticios.

3.2.2.5. *Nariz electrónica*

El fundamento de esta técnica analítica se basa en las diferencias entre los perfiles de compuestos volátiles de las distintas categorías de cerdos ibéricos. Estas diferencias son detectadas por paneles sensoriales entrenados e, incluso, por los consumidores, especialmente por cuestiones de aroma. La técnica analítica más usual para determinar los compuestos volátiles de una muestra es GC-MS (ver apartado anterior). Sin embargo, una **nariz electrónica** simplifica dicho análisis del perfil de volátiles/aroma. Una nariz electrónica es un conjunto de sensores de gases con diferente selectividad, un receptor de señal (transforma la señal química en eléctrica) y un software de reconocimiento de patrones. Los sensores de gases tienen una respuesta selectiva a los compuestos volátiles producidos durante la degradación de las muestras por reacciones oxidativas.

Distintos equipos, tanto comerciales como diseñados específicamente, han sido evaluados para clasificar muestras de CI en los distintos regímenes alimenticios (González-Martín et al., 2000; Carraspiro et al., 2001; García et al., 2003, 2006; Santos et al., 2004) de una forma rápida, pero con limitaciones. Por ejemplo, la optimización de la señal depende de factores como: gas de transporte, temperatura, humedad relativa, tiempo de recuperación de la línea base y el tamaño de la muestra. La Tabla 2.3 muestra los resultados obtenidos por algunos autores en este ámbito.

No obstante, algunas consideraciones realizadas anteriormente para el análisis de compuestos volátiles por GC son aplicables a esta técnica. En primer lugar, la zona de muestreo puede tener su influencia en los resultados. Por otra parte, la conservación de las muestras constituye un aspecto crítico, ya que los compuestos volátiles que se miden con la nariz electrónica proceden de reacciones oxidativas lipídicas y proteicas. Los sensores pueden correlacionarse con el vapor de agua y, por tanto, con la actividad de agua del producto, lo que proporcionaría información no relacionada con el perfil de

ácidos grasos o del régimen alimenticio, lo que conllevaría un efecto negativo en los modelos de clasificación.

En general, la nariz electrónica es una técnica más rápida y barata que un análisis tradicional por GC-MS para analizar el perfil de compuestos volátiles, pero requiere de la optimización de diversos parámetros instrumentales (baño de temperatura, espacio de cabeza, tiempo de exposición, tiempo de recuperación, gas de transporte). Además, se necesitan condiciones de muestreo controladas para prevenir oxidaciones lipídicas indeseables, como el control de la humedad, que influye en los sensores, las altas temperaturas del gas de transporte y la precaución en el tamaño de la muestra y la zona anatómica de donde se toma.

Tabla 2.3. Equipos de nariz electrónica para determinar la categoría comercial de productos de cerdo ibérico.

Artículo	Muestra	Objetivo investigación	Número de muestras				Resultados			
			Bellota	Cebo	No ibérico	Recebo o pienso alto oleico	Bellota	Cebo	No ibérico	Recebo o pienso alto oleico
González-Martín et al., 2000	Tejido adiposo	Evaluación de una nariz electrónica comercial	8	12	-	6 (recebo)	100 %	100 %	-	100 % (recebo)
Carraspiso et al., 2001	Tejido adiposo	Evaluación de una nariz electrónica comercial	30 cerdo ibéricos. 3 músculos distintos fueron analizados de cada animal.				Cada músculo tuvo una composición de ácidos grasos distinta. Los resultados de clasificación fueron independientes para cada músculo individualmente. Confirmaron la capacidad de la Nariz Electrónica para clasificar muestras con distinto perfil de ácidos grasos.			
García et al., 2003a	Músculo de jamón (<i>biceps femoris</i>)	Optimización de los parámetros de configuración y del método de muestreo para una nariz electrónica basada en SnO ₂	5	5	-	-	Optimización del tamaño de la muestra, tiempo necesario en el espacio de cabeza y temperatura del baño. Los sensores respondieron mejor a las muestras de “bellota” que de “cebo”. Un Análisis de Componentes Principales mostró diferentes agrupaciones para muestras de cada categoría.			

Fuente: Elaboración propia

Tabla 2.3. Equipos de nariz electrónica para determinar la categoría comercial de productos de cerdo ibérico (continuación).

Artículo	Muestra	Objetivo investigación	Número de muestras			Resultados				
			Bellota	Cebo	No ibérico	Recebo o pienso alto oleico	Bellota	Cebo	No ibérico	Recebo o pienso alto oleico
Santos et al., 2004	Músculo de jamón (<i>biceps femoris</i>)	Optimización de los parámetros de configuración y del método de muestreo de una nariz electrónica	80 (no especificado) con distintos tiempos de maduración	-	-	-	93 %	92 %	-	Fueron optimizados el gas de transporte y la temperatura de análisis Algoritmos no lineales de reconocimiento de patrones mostraron los mejores resultados de discriminación.
García et al., 2006	Músculo de jamón (<i>biceps femoris</i>)	Discriminación	1 “bellota”* 1 contaminado “bellota”*	1*	1*	-	100 %	100 %	100 %	Algoritmos no lineales de reconocimiento de patrones mostraron los mejores resultados. El jamón contaminado también fue identificado en una categoría diferente.

*5 sub-muestras fueron analizadas.

Fuente: Elaboración propia

3.2.2.6. *Medidas de ultrasonidos*

Los instrumentos de **ultrasonidos** generan ondas de alta frecuencia que viajan a través de un material y son reflejadas entre tejidos de distinta densidad (Houghton y Turlington, 1992). Esta técnica puede ser rápida y no destructiva, lo cual resulta muy interesante para el control de calidad en la industria. Las medidas de ultrasonidos se han estudiado para determinar propiedades físico-químicas de los tejidos, rendimientos de la canal, engrosamiento dorsal o características texturales en productos cárnicos (Pathak et al., 2011). No obstante, la velocidad de ultrasonido en tejido adiposo depende en gran medida de la fracción grasa en estado sólido y líquido, la composición de ácidos grasos y la estructura del tejido, por lo que puede ser una medida interesante y útil para determinar el régimen alimenticio o genotipo de cerdos ibéricos (Niñoles et al., 2007, 2008, 2010, 2011).

La Tabla 2.4 muestra los principales resultados obtenidos con esta tecnología en el sector del porcino ibérico. No obstante, existen diversos aspectos a considerar: se debe prestar atención al tipo de muestra analizada ya que la pendiente de la velocidad de ultrasonidos o tendencia es distinta para muestras de grasa fresca o curada (mayores temperaturas, menor velocidad; aunque con distinta pendiente) (Niñoles et al., 2007, 2008, 2010) o para tejido muscular (mayores temperaturas, mayores velocidades) (Niñoles et al., 2011).

Todos los estudios han demostrado que la temperatura de análisis influye en las medidas de ultrasonidos, siendo un parámetro a controlar. Sin embargo, en todos los casos se han evaluado un amplio rango de temperaturas (entre 0 y 25 °C) para crear modelos, sin concretar una temperatura óptima de trabajo. El uso de un aceite acoplante es necesario para realizar las medidas. Esto puede alterar el concepto de técnica no invasiva ya que se deja un residuo sobre el animal/canal/producto. Niñoles et al. (2010) indicaron que el historial térmico (congelar, descongelar, etc.) de las muestras también tiene su efecto en las medidas, aunque realizar el análisis en el rango de temperaturas entre 10 y 25 °C proporciona datos más estables y robustos que ese efecto.

Tabla 2.4. Medidas de ultrasonidos para autenticar muestras de cerdo ibérico por régimen alimenticio.

Artículo	Muestra	Rango temperaturas medida (°C)	Número de muestras				Porcentaje de muestras correctamente clasificadas según genotipo y régimen alimenticio	
			IPB	CC	CPAO	IPPAO		
Niñoles et al., 2007	Grasa subcutánea	0 - 22	12	12	24	12	94,7 % (parámetro: velocidad de ultrasonido)	100 % (parámetro: ultrasónicos y textura)
Niñoles et al., 2008	Grasa subcutánea de jamón curado	0 - 22	10	10	20	10	78,3 % (parámetro: velocidad de ultrasonido)	87 % (parámetro: ultrasónicos y textura)
Niñoles et al., 2010	Grasa subcutánea de jamón curado	0 - 24	No especificado				Encontraron que el historial térmico de la muestra afecta a las medidas de ultrasonidos, excepto en el rango entre 10 y 24 °C	
Niñoles et al., 2011	Músculo intacto (<i>biceps femoris</i>)	0 - 22	12	-	24	12	87 % (parámetro: velocidad de ultrasonido)	-

IPB: “ibérico puro de bellota”; CC: “cebo cruzado”; CPAO: “cruzado pienso alto oleico”; IPPAO: “ibérico puro de pienso alto oleico”.

Fuente: Elaboración propia

3.2.2.7. Análisis de isótopos estables

Cada elemento tiene una concentración de **isótopos estables** característica o natural. La composición isotópica es como una marca digital que se mantiene a través de toda la cadena alimentaria (atmósfera-suelo-plantas-animales) sin sufrir muchos cambios, sólo aquellos debidos a la síntesis de tejidos; por lo tanto, la composición en isótopos de las alimentos ingeridos por los animales se acumulan y reflejan en los tejidos de éstos. Considerando estos principios, las investigaciones realizadas en este ámbito para la autenticación de productos CI según régimen alimenticio se basan, en general, en determinar la composición de isótopos estables característica de los principales compuestos o sustancias naturales ingeridas por los cerdos para reconstruir su dieta. Sin embargo, cada isótopo tiene una selectividad diferente para reconstruir la dieta, ya que están involucradas distintas rutas metabólicas. Además, se debe tener en cuenta que cada zona de producción o localización tendrá una composición característica para unos mismos elementos, es decir, la concentración de isótopos estables de una bellota y, por tanto, de un animal que las ha ingerido puede ser distinta según las condiciones agroclimáticas de la zona de producción u otros factores que afecten a la misma.

La preparación de las muestras para la espectroscopía de masas por relación de isótopos estables (IRMS, *Isotope-Ratio Mass Spectrometry*) es una tarea compleja y que requiere su tiempo (al menos 3 horas, aunque depende la temperatura de trabajo). El tamaño de la muestra utilizado es normalmente entre 15-25 g, la cual debe ser triturada, desecada y mezclada con distintos productos químicos, según el isótopo a determinar, antes de realizar el análisis. Las etapas del mismo son: una metilación de los ácidos grasos, un análisis por GC para separar los componentes individualmente y una combustión (C) seguida de una criogénesis (temperaturas de análisis entre 850 °C y -196 °C) de las muestras para eliminar gases incondensables en las etapas previas al análisis IRMS que determina la fracción isotópica. Después de la preparación de la muestra, el CO₂ o BaSO₄ o nitrógeno generado por la materia seca es medida por Espectroscopía de Masas para determinar el $\delta^{13}\text{C}$ (¹³C/¹²C ratio), $\delta^{34}\text{S}$ (³³S/³⁴S ratio) o $\delta^{15}\text{N}$ (¹⁵N/¹⁴N ratio), respectivamente. Recio (2007) hace una amplia revisión del uso de GC-C-IRMS en productos del cerdo ibérico. La Tabla 2.5 resume los principales resultados de distintos estudios publicados en la bibliografía sobre la determinación de diversos isótopos en distintas muestras de tejido de cerdo ibérico (adiposo, hígado y músculo).

Esta técnica prometedora, aunque tiene sus limitaciones (Tabla 2.8), permite discriminar entre muestras de “bellota” y “cebo”. No obstante, su viabilidad para caracterizar muestras de “recebo” no está muy clara. Los estudios que se han realizado hasta la fecha han contado con un número reducido de muestras para concluir las hipótesis estudiadas. Además, para generalizar esta técnica como sistema de control de productos derivados de cerdos ibéricos es necesario un estudio más profundo en relación a la influencia que el origen o zona de producción pueda tener en la composición de isótopos estables, dada la amplia heterogeneidad que pueden presentar productos procedentes de distintas regiones.

3.2.2.8. *Análisis de texturas de imágenes*

El primer estudio en este campo fue desarrollado por Petrón et al. (2003) usando un sistema de visión computarizado rápido y de bajo coste, basado en la adquisición de **imágenes en la escala de grises**, a las cuales aplicó un análisis de texturas (algoritmos matemáticos de reconocimiento de patrones). La adquisición de imágenes conllevó la destrucción de las muestras y, aunque la selección de regiones de interés o identificación de músculos específicos para aplicar los algoritmos de análisis de textura fue manual, ésta se puede automatizar.

Tabla 2.5. Discriminación de categorías de cerdo ibérico según régimen alimenticio por análisis de isótopos estables.

Artículo	Muestra	Parámetros	Número de muestras				Resultados
			B	C	R	PAO	
González-Martín et al., 1999	Tejido adiposo (mejores resultados) Hígado Músculo (no diferencias)	$\delta^{13}\text{C}$	65	80	-	-	$y = -22,12 * 0,35 x$; ($R^2=0,982$) $y =$ peso ganado en montanera; $x =$ concentración $\delta^{13}\text{C}$. Para $y = 0-1,5$ es “C”, 1,5-3,5 “R” y 3,5-8 “B”.
González-Martín et al., 2001	Hígado	$\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{34}\text{S}$	9	10	-	-	PCA mostró diferencias entre ambos regímenes alimenticios
Delgado-Huertas et al., 2007	Músculo	$\delta^{15}\text{N}$	52	15	-	10	$\delta^{15}\text{N} < 5$ (B) $\delta^{15}\text{N} > 5$ (C) $\delta^{15}\text{N} > 5$ (PAO)
Nieto y Aguilera, 2009	Músculo	$\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$	25	25	25	-	Mayores concentraciones de $\delta^{13}\text{C}$ y menores de $\delta^{15}\text{N}$ en “B”. No hubo diferencias entre “R” y “C”.
Recio, 2010	Tejido adiposo	$\delta^{13}\text{C}$ de cada ácido graso	53	18	-	57	Valores $\delta^{13}\text{C}$ de los 4 ácidos grasos principales permite discriminar entre “cebo” y el resto de clases; mientras valores $\delta^{13}\text{C}$ del ácido oleico permite discriminar entre “B” y “PAO”

B: “bellota”; C: “cebo”; R: “recebo”; PAO: “pienso alto oleico”.

Fuente: Elaboración propia

Recientemente, se han utilizado imágenes RGB de alta resolución para estudiar la distribución espacial de la grasa-tejido conectivo en carne de cerdo ibérico mediante análisis multifractal (Serrano et al., 2012a). Profundizar en el análisis multifractal de imágenes y, en concreto, estudiar el patrón de infiltración de la grasa en el tejido porcino, puede abrir nuevas estrategias de clasificación de productos derivados del cerdo ibérico. No obstante, hay que tener en cuenta que esta técnica realiza el análisis de texturas a nivel superficial por lo que el tamaño de la muestra puede influir en los resultados proporcionados por los algoritmos matemáticos aplicados.

Otra aproximación radica en el uso de **imágenes de resonancia magnética** (MRI, *Magnetic Resonance Imaging*) como técnica de adquisición de imágenes. MRI explora las propiedades magnéticas de los núcleos atómicos de

hidrógeno que constituyen la muestra de forma espacial en una imagen. De esta forma, los cambios texturales que pueden estar relacionados con la composición de la grasa, es decir, régimen alimenticio de los animales, pueden ser detectados por MRI al estar los tiempos de relajación de los átomos influenciados por la fluidez de la grasa y el agua retenida, lo que a su vez depende del perfil de ácidos grasos y otros componentes presentes en la muestra (como tocoferoles) (Pérez-Palacios et al., 2010, 2011). Por tanto, el uso de imágenes MRI como técnica de visión computarizada en combinación con algoritmos de reconocimientos de patrones (análisis de texturas) puede ser considerada como una técnica útil para identificar distintas calidades en productos de CI.

Los instrumentos evaluados en estos estudios de viabilidad fueron equipos grandes utilizados para diagnóstico médico que están constituidos por un imán dispuesto alrededor de la muestra, un transmisor de radio frecuencias, un receptor y un ordenador. Más concretamente, era un equipo MRI de bajo campo operando en un campo magnético de fuerza 1,5 Tesla, lo que resulta en un equipo de menor resolución y menor coste (aunque sigue siendo un instrumento muy caro) en comparación con equipos de alto campo (Pérez-Palacios et al., 2010, 2011). Dado que la radiación penetra los materiales analizados bastante bien, proporciona información del producto por debajo de la superficie, por lo que no es necesaria la destrucción de la muestra. Además, éste es un análisis relativamente rápido que, sin embargo, proporciona grandes y complejas bases de imágenes que requieren de herramientas matemáticas complejas para detectar diferencias en el análisis textural. No obstante, MRI puede no tener la misma selectividad que otras técnicas y, por tanto, no ser tan sensible a la información físico-química de la muestra.

Los resultados más relevantes en esta área se recogen en la Tabla 2.6 de cara a la discriminación de muestras procedentes de cerdo ibéricos con distintos regímenes alimenticios. No obstante, hay que tener en cuenta que imágenes MRI se han utilizado también para determinar el nivel de vetado (Cernadas et al., 2002; Antequera et al., 2003; Ávila et al., 2007) y características sensoriales (Antequera et al., 2003; Cernadas et al., 2005) de productos cárnicos. Además, se ha evaluado como técnica de control de la difusión de NaCl en carne (Hansen et al., 2008) o para controlar el proceso de curación en el jamón (Antequera et al., 2007).

Tabla 2.6. Investigaciones realizadas con técnicas de imagen para autenticación de productos de cerdo ibéricos según régimen alimenticio.

Artículo	Muestra	Parámetro determinado	Número de muestras			Porcentajes de muestras correctamente clasificadas (%)		
			B	C	PAO	B	C	PAO
Petrón et al., 2003	Jamón fresco	Imágenes en escala gris con análisis textural	18	16	-	73,60*	87,36*	-
	Jamón curado	Imágenes en escala gris con análisis textural	21	12	-	83,85*	91,65*	-
Pérez-Palacios et al., 2010	Jamón curado	Análisis textural de imágenes MRI	10	-	10	PCA mostró claras diferencias	-	PCA mostró claras diferencias
Pérez-Palacios et al., 2011	Jamón fresco	Análisis textural de imágenes MRI	15	-	15	PCA mostró claras diferencias	-	PCA mostró claras diferencias

B: “bellota”; C: “cebo”; PAO: “pienso alto oleico”.

*Son resultados mediados sin considerar diferencias entre genotipos o músculos.

Fuente: Elaboración propia

3.2.2.9. Espectroscopía de movilidad de iones

El principio medido con **espectroscopía de movilidad de iones** (IMS, *Ion Mobility Spectroscopy*) es la movilidad relativa frente al tiempo de los iones que constituyen la muestra. Esta técnica analítica determina los compuestos volátiles y semivolátiles, mediante una separación de gases, de los iones resultantes expuestos a un campo electrónico de baja intensidad a presión ambiente (Armenta et al., 2011). Esta técnica electroforética gaseosa es una herramienta rápida y barata para caracterizar compuestos, aunque la preparación de las muestras puede conllevar bastante tiempo, uso de productos químicos y altas temperaturas de trabajo. La Tabla 2.7 muestra los resultados más relevantes obtenidos con esta técnica en el único estudio publicado hasta la fecha con muestras procedentes de cerdo ibérico.

Tabla 2.7. Espectroscopía de movilidad de iones como técnica de clasificación de productos de cerdo ibérico según régimen alimenticio.

Artículo	Muestra	Parámetro determinado	Número de muestras			Porcentaje de muestras correctamente clasificadas (%)		
			B	C	PAO	B	C	PAO
Alonso et al., 2008	Tejido adiposo	Movilidad de iones de compuestos volátiles	23	20	23	95,5	70,0	85,75*
						95,5	97,7^	-

B: “bellota”; C: “cebo”; PAO: “pienso alto oleico”.

*Dos categorías de piensos alto oleico fueron consideradas, la tabla muestra el % medio de muestras correctamente clasificadas por el método para ambas sub-categorías.

^Cuando la categoría “pienso alto oleico” es considerado como “cebo”, el % de muestras correctamente clasificadas se incrementó.

Fuente: Elaboración propia

3.2.2.10. Reflexiones generales sobre los métodos analíticos utilizados en el control de calidad de productos derivados del cerdo ibérico

La Tabla 2.8 resume las características principales de las técnicas descritas en esta sección. Además en dicha tabla, para hacer más completa la comparativa, se han incluido las características principales de la tecnología de espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS, *Near Infrared Reflectance Spectroscopy* en inglés). Esta tecnología es ampliamente descrita en la siguiente sección, ya que además es la técnica empleada y evaluada en esta tesis doctoral.

La mayoría de los métodos requieren de un procedimiento de preparación de muestra donde se destruye la misma y se usan distintas sustancias químicas. No ocurre lo mismo con el método empleado para la sensación táctil, medida por ultrasonidos o la espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano y la adquisición de imágenes por resonancia magnética. La mayoría de las técnicas analíticas, sobre todo las basadas en métodos cromatográficos, son lentas lo cual limita su implantación en el diseño de sistemas de control de calidad/autenticación en tiempo real. MRI es un caso especial, ya que, aunque no es un análisis destructivo y es relativamente rápido, el instrumento evaluado es de altas prestaciones (alto precio) y, por tanto, no adecuado para aplicaciones industriales. En general, todos los procedimientos revisados tienen en común la alta inversión en instrumentación a realizar, aunque no tan elevada como en MRI. Los equipos NIRS y de ultrasonidos pueden ser los de menor coste, aunque varía según las características del instrumento.

Aparte de las características descritas en la Tabla 2.8, se debe tener en cuenta que la mayoría de estas técnicas analíticas pueden verse afectadas por la variabilidad anual de los recursos naturales disponibles en la dehesa. Además, se ha puesto de manifiesto que la zona anatómica elegida para realizar el muestreo puede tener efecto en los resultados. Por lo tanto, se deben establecer correctamente protocolos o procedimientos de muestreo para minimizar estos efectos.

En general, la mayoría de las investigaciones utilizan un número reducido de muestras y, normalmente, de “bellota” y “cebo”, que son categorías de calidad extremas. Factores como variabilidad anual o territorial no han sido, en general, incluidos en el diseño experimental. No obstante, dado el volumen de publicaciones y los resultados publicados, la determinación del perfil de ácidos grasos o hidrocarburos mediante técnicas cromatográficas y la espectroscopía de reflectancia del infrarrojo cercano (ver sección 3.3) pueden ser considerados como los métodos que presentan resultados más robustos.

Consumidores, legisladores y, en general, todos los participantes en la cadena productiva del sector del cerdo ibérico (productores, industriales y comerciales) están interesados en nuevos métodos fiables y de bajo coste que permitan asegurar la calidad de los productos derivados. Como se ha descrito,

existen un gran número de técnicas con sus ventajas y limitaciones para la autenticación de productos de CI según régimen alimenticio.

Tabla 2.8. Características de las distintas técnicas analíticas aplicadas a la caracterización y clasificación de productos de cerdo ibérico según régimen alimenticio.

Técnica	Análisis	Tiempo de análisis	Respeto medioambiente	Temperatura de trabajo	Necesidad personal cualificado	Costes	Otras características
Sensación táctil	No destructivo	-	Si	Temperatura ambiente	Si / No	-	Subjetivo
Punto de fusión	Destructivo	-	Si	-	No	Bajo coste	
Índice de yodo	Destructivo	-	No (requiere químicos)	Temperatura ambiente	Si	Bajo coste	
Perfil de ácidos grasos – técnica cromatográfica	Destructivo	Tiempo de purga/extracción: 14-15 min Análisis GC: 20 min Es necesario un tiempo de recuperación	No (químicos y gas de transporte son necesarios)	Análisis GC requiere altas temperaturas controladas (220 °C)	Si	~20.000 € (GC instrumentación) 12,86 € por muestra*	Tamaño de muestra pequeño. Algunos autores usan horno microondas en vez de la saponificación para la extracción de metil ésteres.

*Precio público en el “Laboratorio Agroalimentario de Córdoba” de la Junta de Andalucía - España (2011).

Fuente: Elaboración propia

Tabla 2.8. Características de las distintas técnicas analíticas aplicadas a la caracterización y clasificación de productos de cerdo ibérico según régimen alimenticio (continuación).

Técnica	Análisis	Tiempo de análisis	Respeto medioambiente	Temperatura de trabajo	Necesidad personal cualificado	Costes	Otras características
Determinación de antioxidantes (α - y γ -tocoferoles) – técnica cromatográfica	Destructivo	Tiempo de purga: 14-15 min Análisis HPLC: 20 min Es necesario un tiempo de recuperación	No (son necesarios hexano, etanol y un gas de transporte)	Análisis GC requiere altas temperaturas controladas	Si	~50.000 € (HPLC instrumentación) 20-30 € por muestra [^]	Tamaño de muestra pequeño (5 g). Combinación de distintas técnicas: saponificación, HPLC fase reversa, GC. Compuestos en bajas concentraciones.
Compuestos volátiles – técnica cromatográfica	Destructivo	Tiempo de purga: 14-15 min Análisis GC: 20 min Es necesario un tiempo de recuperación	No (químicos y gas de transporte son necesarios)	Temperatura de la muestra durante la purga: 45°C Análisis GC entre 40°C y 225°C	Si	~130.000 € (HS-GC-MS instrumentación)	Tamaño de muestra pequeño (0,5-3 g)

[^] Estimación calculada por la Dra. Ana Rey de la Universidad Complutense de Madrid – España (2011).

Fuente: Elaboración propia

Tabla 2.8. Características de las distintas técnicas analíticas aplicadas a la caracterización y clasificación de productos de cerdo ibérico según régimen alimenticio (continuación).

Técnica	Análisis	Tiempo de análisis	Respeto medioambiente	Temperatura de trabajo	Necesidad personal cualificado	Costes	Otras características
Identificación y cuantificación de hidrocarburos lineales y/o ramificados – técnica cromatográfica	Destructivo	Tiempo de purga: 14-15 min Análisis GC: 20 min Es necesario un tiempo de recuperación	No (químicos y gas de transporte son necesarios)	Análisis GC requiere altas temperaturas controladas	Si	~20.000-90.000 € (GC o GC-MS instrumentación)	Tamaño de muestra pequeño. Estos compuestos están en muy pequeñas concentraciones
Perfil de triglicéridos – técnica cromatográfica	Destructivo	Tiempo de purga: 14-15 min Análisis GC: 20 min Tiempo de recuperación es necesario	No (es necesario utilizar hexano y un gas de transporte)	Gas de transporte: 320 °C Análisis GC: 350 °C	Si	~30.000-50.000 € (GC o HPLC instrumentación)	Tamaño de muestra pequeño
Nariz Electrónica	Destructivo	Alrededor de 30 min, según el instrumento. Hay distintas etapas: baño de extracción, exposición a los sensores y tiempo de recuperación.	No (necesita un gas de transporte)	Temperatura del baño de extracción entre 30 y 50 °C. Temperatura del gas de transporte 250 °C	Si	~80.000-90.000 €	Posibilidad de miniaturizar los instrumentos. Pequeño tamaño de muestra: ~5 g

Fuente: Elaboración propia

Tabla 2.8. Características de las distintas técnicas analíticas aplicadas a la caracterización y clasificación de productos de cerdo ibérico según régimen alimenticio (continuación).

Técnica	Análisis	Tiempo de análisis	Respeto medioambiente	Temperatura de trabajo	Necesidad personal cualificado	Costes	Otras características
Medidas de ultrasonido	No destructivo No invasivo	Relativamente rápido	Si (un aceite acoplante es necesario)	Se requiere controlar la temperatura	Si	~24.000 €	Puede realizar análisis <i>in situ</i>
Espectroscopía de Infrarrojo Cercano	No destructivo No invasivo (aunque depende del modo de análisis)	Depende de la instrumentación utilizada y el modo de análisis (entre milisegundos a 1-2 minutos)	Si	Temperatura variable entre 5°C y 40°C	No es necesario un perfil técnico para realizar análisis de rutina (sólo es necesario un simple entrenamiento) Personal cualificado es necesario para desarrollar los modelos de calibración y su mantenimiento.	~17.000-70.000 € (depende del instrumento) 4 € por muestra ⁺	Instrumentación versátil y flexible. Multi-parámetro (químico/físico) Aproximaciones cualitativas y cuantitativas

⁺ Precio público en el laboratorio del “Servicio Centralizado de Apoyo a la Investigación” de la Universidad de Córdoba – España (2011).

Fuente: Elaboración propia

Tabla 2.8. Características de las distintas técnicas investigadas para la clasificación de productos ibéricos según régimen alimenticio (continuación).

Técnica	Análisis	Tiempo de análisis	Respeto medioambiente	Temperatura de trabajo	Personal cualificado	Costes	Otras características
Isótopos estables	Destructivo	>3 horas	No (químicos y gas transporte son necesarios)	max: 850 °C min: 196 °C	Si	~90.000 € (GC-MS instrumentación) 77-110 € por muestra (según isótopo) ^o	Tamaño de la muestra: 15-25 g. Combina GC, combustión, criogénesis y MS.
Imágenes por Resonancia Magnética	No destructivo No invasivo	Relativamente rápido	Si	Temperatura ambiente	Personal altamente cualificado	~1.000.000 € (Instrumentación clínica)	Posibilidad de realizar imágenes 3D. Las imágenes son inherentemente ruidosas. Multi-parámetro (sensorial, veteado, distribución NaCl)
Espectroscopía de Movilidad de Iones	Destructivo	> 40 minutos: preparación de muestra 2 minutos para análisis	Nitrógeno puro como gas de transporte es necesario	150 °C	Asistencia técnica profesional	~60.000 €	Posibilidad de miniaturización. Tamaño de muestra: 1 g

^o Precio público en el laboratorio del “Servicio General de Análisis de Isotopos Estables” de la Universidad de Salamanca - España (2007).

Fuente: Elaboración propia

3.3. Espectroscopía en el infrarrojo cercano

3.3.1. Fundamentos teóricos de la espectroscopía en el infrarrojo cercano

Descubierta por Herschel en 1800 (Herschel, 1800) y no desarrollada tecnológicamente e instrumentalmente hasta la década de los sesenta por el grupo de investigación de Karl Norris en el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA, *United State Department of Agriculture*) (Hart y Norris, 1963; Norris y Hart, 1965), la espectroscopía de reflectancia del infrarrojo cercano (NIRS, por sus siglas en inglés de *Near Infrared Reflectance Spectroscopy*) es una técnica espectroscópica vibracional basada en la región espectral del infrarrojo cercano que va desde los 770 a los 2.500 nm (longitudes de onda) o lo que es lo mismo desde los 12.900 cm^{-1} a los 4.000 cm^{-1} (número de onda) (ISO 12099:2010).

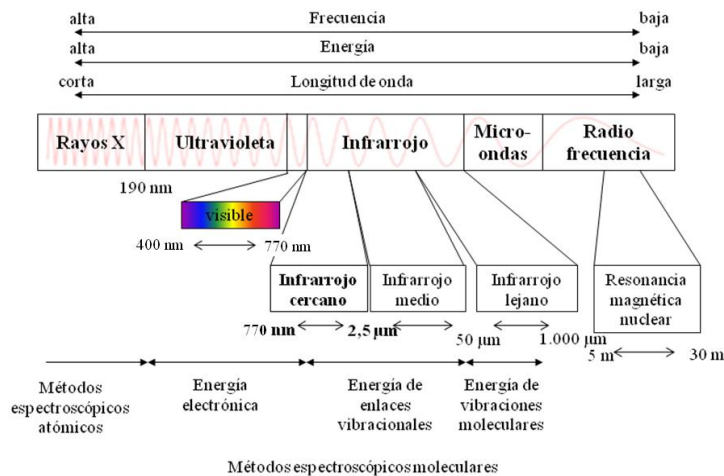


Figura 3.1. Regiones del espectro electromagnético.

Adaptado de Pavia et al., 2000.

Las longitudes de onda correspondientes a la región del infrarrojo cercano son las más energéticas de todo el rango del infrarrojo (Figura 3.1) y, por lo tanto, sus frecuencias características le proporciona una serie de propiedades específicas. La Figura 3.2 muestra los distintos fenómenos que se producen cuando la energía radiante interactúa con la materia. Estos pueden ser fenómenos de absorción en los que la energía es absorbida por la materia, de reflectancia difusa cuando parte de la luz incidente que llega a la superficie, penetra en la muestra y es reflejada (contiene información sobre la muestra) o de transmisión, cuando parte de la radiación atraviesa la muestra completamente, saliendo por el lado opuesto a la fuente de luz. No obstante, también ocurren fenómenos de pérdida de energía por refracción, reflexión especular, en la que la radiación llega a la superficie y es reflejada sin llegar a

penetrar la muestra; y por tanto, no contiene información, y/o, por último, fenómenos de radiación dispersa (*scatter*), cuando la radiación no reflejada que penetra la muestra y es dispersada en múltiples direcciones, viéndose afectada por el tamaño de partícula y el índice de refracción (Shenk, 1992; Dahm y Dahm, 2001; Siesler et al., 2002).

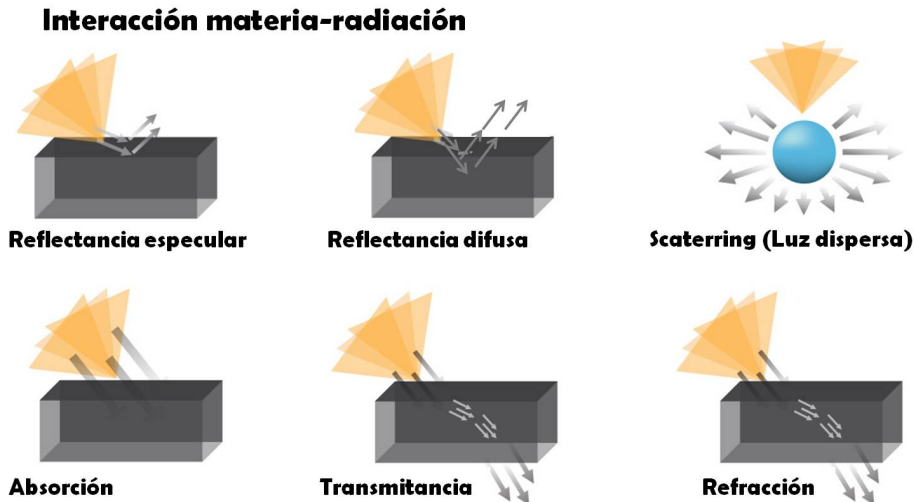


Figura 3.2. Fenómenos de interacción entre la radiación electromagnética y la materia. Adaptado de Clinuvel Pharmaceuticals, 2010.

La espectroscopía de infrarrojo cercano, como técnica espectroscópica vibracional, se basa en las vibraciones moleculares que se producen al incidir una determinada frecuencia en la molécula; esa frecuencia activadora dependerá de la fuerza del enlace químico entre átomos, sus masas atómicas y las interacciones intermoleculares. La energía NIR es absorbida cuando las moléculas cambian su momento dipolar debido a la vibración. Estas vibraciones en la región NIR pueden ser explicadas por el movimiento oscilatorio anarmónico, ya que los enlaces moleculares pueden excitarse a niveles de energía que no están uniformemente espaciados. Las transiciones energéticas permitidas son, por lo tanto, observadas no sólo en las bandas de frecuencias fundamentales ($\Delta n = \pm 1$), como es el caso de la región del infrarrojo medio (MIR, por sus siglas en inglés - *Mid-Infrared Region*), sino que aparecen sobretonos a transiciones energéticas del número cuántico vibracional n iguales a $\Delta n > \pm 1$ y también en combinaciones de bandas, esto es suma o diferencia de frecuencias fundamentales (Siesler et al., 2002).

Un espectro NIRS es una representación gráfica de la intensidad reflejada o transmitida por la muestra en función de las longitudes de onda. Dicho espectro está compuesto, básicamente, por sobretonos y combinaciones de bandas que se caracterizan por ser bandas anchas, solapadas y de baja intensidad, que a diferencia de la región del infrarrojo medio, no pueden ser interpretadas o asignadas a un compuesto químico determinado (Figura 3.3).

No obstante, las bandas en la región NIR están dominadas por enlaces moleculares del tipo X-H, donde X puede ser: un átomo de carbono (grupo metilo C-H, aromático, metileno, metoxi o carbonilo), un nitrógeno (N-H de un grupo amino o amida), un oxígeno (grupo O-H del agua o un alcohol), un azufre (S-H) o grupos C=O (C=OH), que dan una huella físico-química única para cada material analizado (Williams y Norris, 2001a;

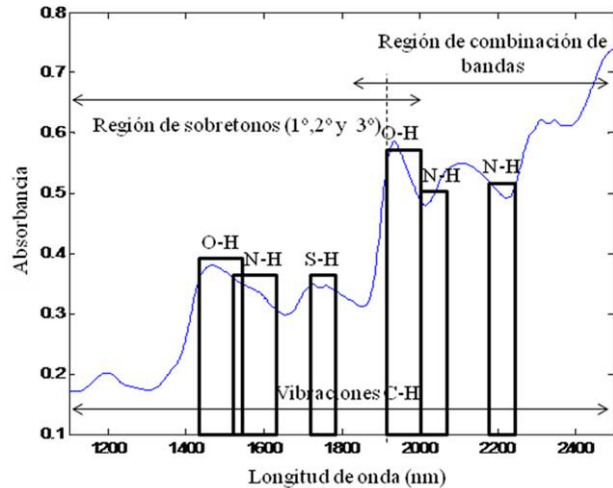


Figura 3.3. Representación gráfica de un espectro electromagnético en el infrarrojo cercano. Fuente: Elaboración propia.

Osborne et al., 1993). Sin embargo, dos espectros de un mismo material pueden presentar ligeras diferencias debido a factores como temperatura, humedad, cristalinidad, tamaño de partícula (afectan a la dispersión de la radiación), etc., que pueden producir efectos aditivos, multiplicativos y/o curvaturas de la línea base. Por otra parte, el espectro puede estar sometido a otras fuentes de error: aquellas relacionadas con el instrumento (relación señal/ruido, precisión en la longitud de onda, linealidad de la señal, tipo y tamaño de cápsula etc.) y operacionales (preparación de muestra, errores del analista, estrategia de calibración, modelos quimiométricos, etc.), aparte de las anteriormente relacionadas con la muestra (Williams y Norris, 2001b).

En una situación ideal, la señal medida por un instrumento debería ser el espectro de absorción de las muestras. Sin embargo, la mayoría de los espectrofotómetros miden la radiación no absorbida, más que la radiación que se absorbe. Sólo en el caso en que estas medidas sean realizadas de una manera adecuada, se obtendrán espectros de absorción válidos. Afortunadamente, en la mayoría de los casos no se requiere la medida de la absorción absoluta de las muestras, sino que se plantea como objetivo la medida, con una alta precisión, de la absorción relativa respecto a una referencia estable. En este sentido, podemos aplicar la ley de Beer-Lambert que define la correlación entre la concentración de un analito y su absorbancia a una determinada longitud de onda. Aunque teóricamente no es exacta para la espectroscopía NIR, dado que sólo es válida en ausencia de luz dispersa en la muestra (Osborne, 2000), ha sido y es ampliamente utilizada. La radiación absorbida no puede ser directamente medida. Por eso, se recurre a medir la transmitancia o reflectancia difusa para correlacionarla con la luz absorbida según la siguiente ecuación:

$$\text{Absorbancia} = \log\left(\frac{I_0}{I_t}\right) = -\log T = \varepsilon(\lambda) \cdot b \cdot c$$

$$\text{Absorbancia} = \log\left(\frac{1}{R}\right) = -\log\left(\frac{I_0}{I_r}\right) = \frac{\varepsilon(\lambda) \cdot c}{s}$$

donde I_0 es la intensidad de la radiación incidente en la muestra, I_t se refiere a la intensidad transmitida a través de la muestra, T es la transmitancia, R la reflectancia, I_r corresponde a la intensidad reflejada, ε es el coeficiente de absorción molecular como función de la longitud de onda (λ), b es el paso óptico de la luz a través de la muestra, s es el coeficiente de dispersión y c es la concentración de las moléculas absorbentes.

El paso óptico es un factor a controlar en las medidas dada su importancia en la ecuación. En transmitancia se define por el espesor de la cubeta; mientras en reflectancia es función de la estructura microscópica del material analizado. Este hecho hace necesario definir el paso óptico efectivo, lo cual se consigue mediante el uso de cápsulas y modos de compactación del material en los mismos.

El uso de valores de absorbancia expresados como $\log(1/R)$ o $\log(1/T)$ está ampliamente extendido en el análisis de productos agroalimentarios frente a otras aproximaciones como $\log(1/R')$, siendo R' la reflectancia relativa. Olinger et al. (2001) expusieron los fundamentos teóricos en los que estaban basadas varias de las teorías desarrolladas para explicar el fenómeno de reflectancia difusa, deteniéndose con gran nivel de detalle en la teoría de Kubelka-Munk. Para el análisis de productos agrícolas en la región NIR, donde no se practica la dilución en matriz no absorbente, y donde los analitos raramente varían más de uno o dos factores, es preferible el uso de $\log(1/R)$. Griffiths argumentaba una razón práctica: el uso de $\log(1/R)$ proporciona mejores resultados. A pesar de todo, la razón última empleada para apoyar su elección es que en los casos en los que existe una línea base irreproducible, las intensidades de las bandas variarán con la función de Kubelka-Munk, pero no con $\log(1/R)$. Si además se aplica una derivada, los resultados serán más reproducibles con $\log(1/R)$.

Hay cuatro modos de análisis NIRS principales: reflectancia, transmitancia, interactancia y transflectancia (Shenk y Westerhaus, 1995) (Figura 3.4). Cada modo tiene sus ventajas y limitaciones. La reflectancia (para muestras sólidas y semisólidas) es el modo de análisis que mide la reflectancia difusa (luz reflejada que ha penetrado la superficie de la muestra). La transmitancia (para muestras gaseosas, líquidas, semilíquidas y sólidas) mide la luz que ha atravesado la muestra y es detectada en el lado opuesto a la fuente de radiación. La transflectancia (para muestras líquidas y semilíquidas) es un híbrido de las dos anteriores en el cual la radiación atraviesa la muestra, es reflejada en una superficie reflectante (generalmente oro) en contacto con la

misma, vuelve a atravesar la muestra y es, entonces, cuando llega al detector. La modalidad de interactancia se basa en un sonda de fibra óptica donde el detector está separado de la fuente de radiación, pero ambos en contacto directo con la superficie del producto (Osborne, 2000). Los modos de análisis NIRS de reflectancia e interactancia son los más indicados para desarrollar aplicaciones *in situ*, en el campo, en la línea de procesado o para colocarlos en sensores remotos dada la versatilidad en cuanto al modo de presentación de muestra y sus características de análisis.

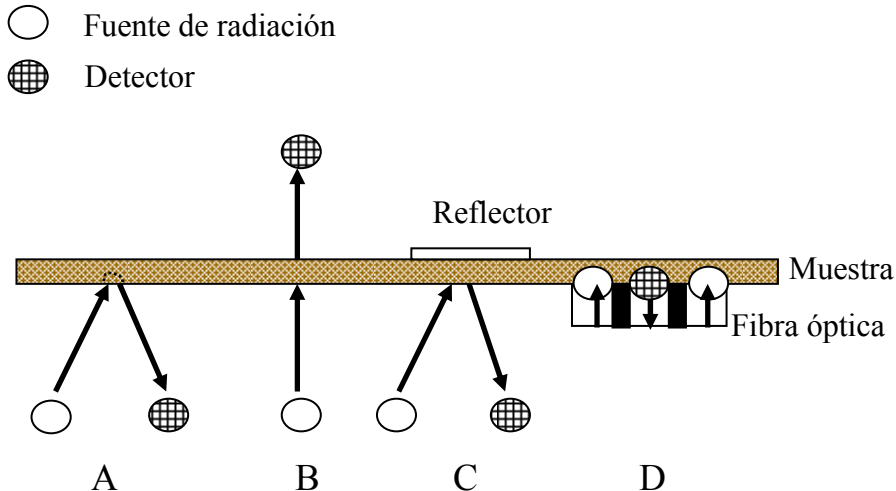


Figura 3.4. Esquema que representa los distintos modos de análisis NIRS. A) Reflectancia, B) Transmitancia, C) Transflectancia y D) Interactancia.

Resumiendo, la tecnología NIRS puede ser considerada como un sensor fiable donde un mismo espectro proporciona información multivariante, tanto física como química, de una sustancia o producto, la cual necesita de un adecuado análisis matemático/quimiométrico (FDA, 2004) para poder ser interpretada o de utilidad. Estos sensores tienen todos los atributos necesarios para ser implementados en sistemas de control de calidad automáticos y modernos en múltiples industrias como la agroalimentaria, farmacéutica, biomedicina o medioambiental como ejemplos.

Todo lo anteriormente expuesto, se traduce en una serie de características que hacen que la tecnología NIRS sea ideal para desarrollar multitud de aplicaciones en diversos campos:

- Análisis rápido: dependiendo del diseño instrumental puede tardar entre minutos o milisegundos.
- Análisis simple: es necesaria una escasa o nula preparación de muestra.
- No invasiva: el análisis puede realizarse sin contacto con la muestra o simplemente en contacto con la superficie de la misma.

- No destructiva: la región NIR (770 – 2.500 nm) se corresponde con niveles de energía entre 40 y 20 kcal/mol; niveles inferiores a los necesarios para romper enlaces covalentes (entre 50-130 kcal/mol).
- Multi-producto: la misma tecnología puede ser empleada con distintos productos.
- Multi-parámetro: un espectro NIRS contiene múltiple información fisico-química en una misma medida.
- Respetuosa medioambientalmente: no es necesario usar ningún agente químico y, por lo tanto, no genera residuos.
- Reducido coste analítico por muestra en análisis de rutina.
- Diseños instrumentales versátiles y flexibles: nuevos avances en óptica y electrónica permiten diseñar instrumentos NIRS adaptados a cualquier aplicación, miniaturizables, portátiles y con conexión inalámbrica a la red de computación en la nube (*cloud computing*).

No obstante, hay algunos aspectos de la tecnología NIRS que puede ser hándicaps para su implementación:

- Método analítico secundario: en la mayoría de los casos es necesario un análisis de referencia, por vía húmeda, para desarrollar modelos de calibración.
- No es un método universal: los modelos desarrollados sólo son de aplicación para muestras bien definidas o similares a las muestras usadas en la calibración.
- Inversión media-alta en instrumentación: existe disparidad de casas comerciales e instrumentos con distintos precios, aunque en la mayoría de los casos estos son elevados.
- Coste medio-elevado del desarrollo de modelos multivariantes: requiere personal técnico cualificado para crear bases de datos, desarrollar modelos y supervisar y recalibrar las ecuaciones.
- Necesidad de diseñar y ejecutar un proyecto de innovación/implantación (2-3 años) en caso de incorporación de esta tecnología en nuevas empresas sin experiencia previa, ya que hay que realizar la selección del instrumento/software más idóneo, formación de personal técnico, caracterización espectral y química del producto, etc. Esto es consecuencia de que un sensor NIRS no es un simple analizador, sino que hay que verlo como una parte esencial de un sistema de control de productos o procesos en la industria donde están involucrados todos los responsables de la toma de decisiones.

- Transferir modelos desarrollados en un instrumento a otro es una tarea compleja, aunque los instrumentos sean de la misma casa comercial, que requiere el empleo de distintos métodos matemáticos de estandarización.

3.3.2. Instrumentación NIRS de vanguardia

Desde el descubrimiento de la tecnología NIRS ya han pasado 213 años. McClure (2003) hace una excelente revisión de todas sus épocas (época del descubrimiento: 1800-1939; época de la agricultura: 1960-1979; etapa de la quimiometría: 1980-1989; edad industrial: 1990-1999; época de la imagen y miniaturización: 2000-actualidad), tanto en instrumentación como en aplicaciones, pero bien es cierto que aunque han existido y existen diversas configuraciones instrumentales, todas ellas cuentan con cinco componentes básicos: fuente de radiación, dispositivo de discriminación de longitudes de onda, zona de presentación de la muestra, detector y procesador de la señal (Shenk y Westerhaus, 1995).

- Fuente de radiación: térmicas (cubren un amplio espectro, pero pueden calentar la muestra como ejemplo lámparas halógenas de cuarzo o filamentos de tungsteno) o no térmicas (emite radiación en un estrecho rango de longitudes de onda como ejemplos los diodos emisores de luz (LED, *Light-Emitting Diode*) o láseres).
- Filtros o codificadores de longitudes de onda: ópticos de interferencia (sólo dejan pasar una determinada longitud de onda), dispersivos (las longitudes de onda son separadas espacialmente mediante un prisma o rejilla de difracción), interferométricos (usa moduladores de la luz que no producen ningún ángulo de difracción), filtros lineales variables (material óptico que deja pasar distintas longitudes de onda a lo largo del mismo) o filtros electro modulables (la longitud de onda que atraviesa al dispositivo es controlada eléctricamente aplicando un voltaje, una señal acústica, etc. como en el caso de filtros acústico-ópticos modulables, filtros de líquido de cristal sintonizables o filtros modulables basados en sistemas micro-electro-mecánicos).
- Zona de presentación de la muestra: lugar donde se produce la interacción entre la radiación NIR y el producto analizado. Existen distintos dispositivos y ventanas diseñadas para que puedan adaptarse a distintos materiales. El diseño correcto de este dispositivo es crítico para obtener información espectral de calidad.
- Detector: la mayoría de los espectrofotómetros usan un único detector, mientras otros se basan en redes de diodos lineales o multidimensionales para acoplar varios detectores, según el rango de longitudes de onda que se quieran detectar. Hay detectores de fotones (fotoconductores y fotodiodos) y detectores térmicos. Los fotoconductores como los detectores de plomo y azufre (PbS) o plomo y selenio (PbSe) operan

cambiando la resistencia y detectan entre 900-3.300 nm, mientras los fotodiodos operan de un modo fotovoltaico al generar una corriente eléctrica en respuesta de los fotones absorbidos. De esta tipología, los más extendidos son los de silicio (Si), que detectan entre 400 y 1.100 nm, y los de indio, galio y arsénico (InGaAs) entre 900 y 2.200 nm. Estos últimos se han popularizado mucho por su respuesta rápida y linealidad frente a detectores PbS o PbSe, aunque estos cubren un rango NIRS más amplio. Por su parte, los detectores térmicos se basan en la energía total irradiada, por lo que sirven en toda la región NIR.

- Unidad de control del instrumento, adquisición y almacenamiento de datos e interacción con el usuario: normalmente es un microprocesador u ordenador que cuenta con un programa capaz de controlar las principales funciones del espectrofotómetro, traducir las intensidades detectadas en datos espectrales (absorbancia en función de la longitud de onda, como ejemplo) que se muestra finalmente al usuario y almacenar dichos datos. En cuanto al procesamiento de los mismos, existen diversos software de tratamiento de datos multivariantes. El usuario debe tener la precaución de guardar los datos en un formato compatible con el software de tratamiento de datos que vaya a utilizar, ya que actualmente no hay ningún protocolo estandarizado común a todos los fabricantes.

Hay diversas configuraciones y diseños de espectrofotómetros, muchos se recogen y describen ampliamente en libros como Williams y Norris (2001c), Workman y Burns (2008) o en el re-aprobado documento de prácticas normalizadas para el análisis cuantitativo multivariante de datos del infrarrojo generado por la Sociedad Americana de Ensayos y Materiales (ASTM, *American Society for Testing and Materials*) (ASTM E1655-05). Sin embargo, el criterio más ampliamente utilizado para clasificar instrumentos NIRS está basado en el dispositivo utilizado para la selección de las longitudes de onda. A continuación se presenta, de forma esquemática, un resumen de estas categorías, teniendo en cuenta que un instrumento NIRS puede trabajar con ciertas longitudes de onda (equipos de longitudes de onda discretas, fotómetros) o con todo el rango espectral NIR (equipos de barrido o espectrofotómetros):

❖ *Instrumentos de longitudes de onda discretas:*

- Filtros de interferencia: una serie de filtros ópticos interferenciales giratorios o basculantes permiten la selección de ciertas longitudes de onda de una luz policromática. Son filtros con un paso de banda estrecho que se colocan delante de la fuente de radiación.
- Diodos emisores de luz (LED-NIR): estas fuentes de radiación no son de amplio espectro, pero pueden colocarse en una red de diodos que emitirían radiación a distintas longitudes de onda. Cada fuente de luz está acoplada

a un pequeño filtro de interferencia que limita las longitudes de onda que pueda emitir el diodo.

❖ *Instrumentos de barrido:*

- Dispositivos dispersivos: usan un prisma, una rejilla, red de difracción, filtros sintonizables eléctricamente (ETF, *Electrically Tuneable Filters*) o filtros lineales variables (LVF, *Linear Variable Filters*) para separar espacialmente o temporalmente la luz policromática en longitudes de onda discretas. Los prismas son un material óptico reflectante no muy utilizado en la actualidad dado su alto coste y peor linealidad en la dispersión de la luz en comparación con otros métodos. Las rejillas o redes de difracción son materiales ópticos reflectantes en cuya superficie hay numerosos surcos paralelos que separan espacialmente la radiación incidente en longitudes de onda discretas. Según la configuración del instrumento, esta red de difracción puede ser móvil (monocromador) o no (red de diodos). Los filtros sintonizables electrónicamente pueden basarse en distintas tecnologías para seleccionar longitudes de onda, ya sea espacialmente, temporalmente o utilizando una combinación de ambas: filtros acústico-ópticos modulables (AOTF, *Acousto-Optical Tuneable Filters*), filtros de líquido de cristal sintonizables (LCTF, *Liquid Crystal Tuneable Filters*) o filtros ópticos modulables basados en sistemas micro-electro-mecánicos (*Micro-Electro-Mechanical Systems (MEMS) Tuneable Optical Filters*). Los filtros lineales variables se basan en un sustrato recubierto por distintas capas repartidas en una dirección donde cada una se caracteriza por filtrar unas determinadas longitudes de onda. Independientemente del sistema de selección de longitudes de ondas, estos instrumentos pueden ser: pre-dispersivos (la difracción de la energía radiante se realiza antes de incidir en la muestra como ejemplo en monocromadores) o post-dispersivos (la luz policromática es dispersada después de irradiar la muestra como ejemplo los instrumentos de red de diodos). En el caso de equipos de red de diodos detectores, que es el ejemplo más popular de equipo post-dispersivo, se basan en una red compacta de miles de detectores de diodos individuales que se colocan en diferentes regiones espectrales de la luz dispersada tras la muestra y, por lo tanto, detectan un único rango de longitudes de onda.

Muchos de estos dispositivos controlados electrónicamente permiten diseñar instrumentos que trabajen simultáneamente con todas o, al menos, con la mitad de las longitudes de ondas simultáneamente con un sólo detector. Este tipo de configuración instrumental se denomina “multiplex” o múltiple. Esto conlleva muchas ventajas relacionadas con la calidad de los datos espectrales, como la mejora del ratio entre la señal (SNR, *Signal to Noise Ratio*) y el ruido.

- Instrumentos basados en transformadas matemáticas para convertir señales digitales modulables de la luz en espectrales (DTS, *Digital Transform Spectroscopy*). Existen dos tipos de instrumentos: interferométricos o basados en la Transformada de Fourier (FT, *Fourier Transform*) o los basados en la transformada de Hadamard. En esta primera parte, se detallan los equipos interferométricos dado que posteriormente se hace una revisión más detallada de equipos basados en la transformada de Hadamard al ser uno de los evaluados en la presente tesis doctoral.

En los instrumentos interferométricos, el rayo incidente es dividido en dos haces de luces de igual potencia cuya trayectoria es modificada para una serie de espejos. Después, éstos se vuelven a recombinar de modo que se pueda medir las variaciones de intensidad de la luz combinada en función de las diferencias de la longitud de la trayectoria de los dos haces. Existen distintos tipos, pero el más común es el interferómetro de Michelson (Figura 3.5) que se basa en dividir un rayo en dos haces de luz. El primero es reflejado en un espejo y llega al detector sin atravesar la muestra y el otro se refleja en otro espejo, llega a la muestra y luego al detector. Uno de los espejos es fijo y el otro móvil (se puede desplazar o tener un retardo, δ) lo que provoca, según la distancia entre ellos que es perfectamente conocida, un desfase de los haces antes de ser recombinados otra vez. Ese retardo produce una señal periódica modulada de las longitudes de onda del rayo incidente en función del tiempo. Por lo tanto, para calcular las intensidades asociadas a cada frecuencia (o longitud de onda) se debe aplicar un tratamiento matemático denominado Transformada de Fourier. Dada las características senoidales de las ondas electromagnéticas, se puede aplicar dicha transformada, ya que establece que cada periodo de la señal a lo largo del tiempo se pueda describir como la suma de senos o cosenos con amplitud (intensidad) y frecuencia variable. Esto conlleva a que finalmente se genere la información espectral de forma que las intensidades sean función de las longitudes de onda.

Es conocido que un espectrofotómetro FT con un mismo tamaño óptico que un instrumento dispersivo tendrá mejor señal-ruido dadas las ventajas de Jaquinot (mejor SNR ya que hay menos elementos ópticos) y de Fellgett (todas las longitudes de onda llegan a la vez al detector, por lo que es menor el tiempo entre medidas y el número de escaneos para obtener un espectro puede ser incrementado para mejorar la SNR). No obstante, hay que tener en cuenta que existen partes móviles que hacen que el instrumento sea sensible a vibraciones, además de que sea más sensible a posibles desajustes.

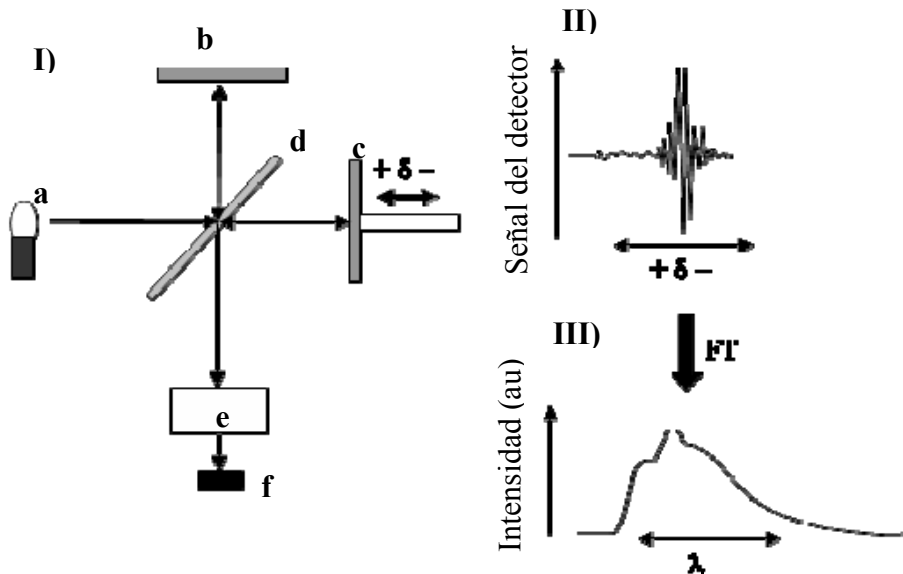


Figura 3.5. I) Diagrama de un interferómetro de Michelson. a) luz policromática; b) espejo fijo; c) espejo móvil; d) divisor de haz de luz; e) zona de muestreo; f) detector; II) interferograma (señal producida por el detector); III) espectro obtenido tras aplicar la Transformada de Fourier (FT) al interferograma. Adaptado de Alcalá et al. 2012.

La SNR de un espectro obtenido por FT-NIR muestra un comportamiento inverso en comparación con el de un instrumento dispersivo. Mientras en este último, SNR depende de la intensidad de la fuente de radiación, ya que la rejilla o dispositivo de dispersión reduce la energía saliente, en un equipo FT-NIR la precisión mecánica del interferómetro es más importante. Por eso, un equipo FT-NIR tiene mejor SNR a largas longitudes de ondas, mientras un equipo dispersivo tiene mejor SNR en longitudes de onda corta.

Independientemente del tipo de espectrofotómetro, los equipos NIRS tradicionales de laboratorio son equipos de mesa por lo que ocupan un gran espacio, no son móviles y necesitan condiciones de trabajo controladas. No obstante, se caracterizan por sus altas prestaciones en cuanto a calidad espectral, rango de longitudes de onda o resolución, que a menudo exceden las necesarias para desarrollar aplicaciones industriales adecuadas. Además, estos instrumentos son frágiles, sensibles a los factores ambientales y necesitan de un sistema de muestreo o de fibras ópticas para analizar las muestras (Schuler et al., 2009).

Avances en otros campos como las telecomunicaciones, óptica y/o electrónica han permitido el desarrollo de nuevos dispositivos con una configuración versátil, de relativo bajo coste, sin partes móviles, compacta, robusta, ergonómica, de tamaño reducido y ligera (miniaturización/portabilidad como las características más innovadoras).

Teniendo en cuenta los objetivos de esta tesis doctoral, a continuación se resumen los avances más relevantes para el diseño y desarrollo de instrumentos NIRS miniaturizados y portátiles. Las innovaciones más interesantes que se han desarrollado en instrumentación desde un punto de vista del diseño de instrumentos robustos, sin partes móviles, portátiles y miniaturizados han sido los avances en filtros sintonizables eléctricamente (ETF) (dispositivo cuya transmisión espectral puede ser controlada eléctricamente según el voltaje aplicado, señal acústica, etc. (Gat, 2000)) y los filtros lineales variables (LVF). A continuación, se describen las características principales de los ETF y LVF, haciendo un mayor énfasis en los filtros MEMS (subtipo de ETF) ya que forman parte de los instrumentos evaluados en esta tesis doctoral:

- Filtros acústico-ópticos modulables (AOTF, *Acousto-Optical Tuneable Filters*) (Figura 3.6): combinan radio frecuencias y señales eléctricas para difractar la luz sin necesidad de partes móviles. Un transductor piezoeléctrico acústico genera una determinada onda de frecuencia que produce una vibración en un cristal birrefringente (normalmente de óxido de telurio, TeO_2 , ya que es transparente a la radiación entre 400 y 5.000 nm) acoplado a éste que a su vez actúa como filtro espectral al comprimirse y relajarse según la frecuencia de la onda acústica generada. El fundamento se basa en que según la frecuencia que llega al cristal, varía la longitud de onda que puede atravesarlo (Gat, 2000).

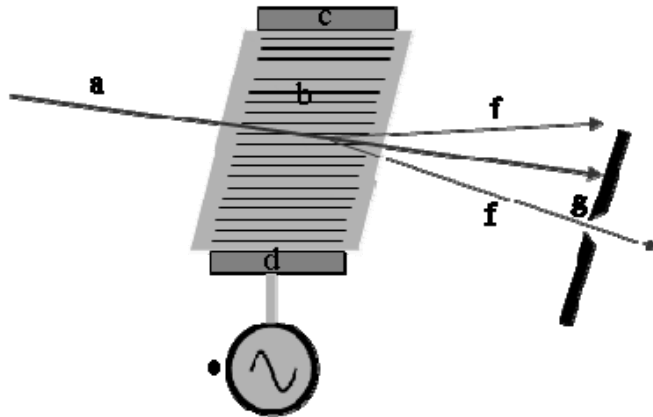


Figura 3.6. Esquema de un monocromador basado en tecnología AOTF. a) luz policromática; b) cristal TeO_2 ; c) amortiguador acústico; d) transductor piezoeléctrico acústico; e) fuente de frecuencias de radio variables; f) luz monocromática; g) filtro salida. Adaptado de Alcalá et al. 2012.

Estos tipos de filtros tienen las ventajas de que el tiempo necesario para seleccionar una determinada longitud de onda es de escasos microsegundos, no requiere de partes móviles ya que está controlado electrónicamente por la radio frecuencia generada y, además, los dispositivos disponibles para generar dichas ondas de frecuencia son

bastantes precisos y exactos, por lo que la selección de las longitudes de onda también. No obstante, poseen ciertas limitaciones como las debidas a las variaciones de temperatura del cristal de TeO_2 , ya que variaciones de un grado centígrado puede que causar desplazamientos de las longitudes de onda de alrededor de 0,025 nm. Además, la transferencia de modelos entre equipos basados en filtros AOTF es normalmente más compleja frente a otras tecnologías (Gat, 2000).

- Filtros de líquido de cristal sintonizables (LCTF, *Liquid Crystal Tuneable Filters*): este tipo de filtros ETF también permiten la difracción de la luz sin la necesidad de incluir partes móviles en el diseño instrumental. Se componen de una serie de polizadores y cristales birrefringentes líquidos que según el voltaje aplicado dejan atravesar una longitud de onda u otra. Se caracterizan por ser filtros muy rápidos y de alta calidad, por lo que se suelen emplear en equipos hiperespectrales. Una variación de LCTF son los filtros formados holográficamente por polímeros dispersos de cristales líquidos (H-PDLC, *Holographically-formed, Polymer Dispersed Liquid Crystal*) que se componen de micro gotas de cristal líquido dispersadas aleatoriamente en un polímero. Esa dispersión aleatoria hace que el filtro tenga una apariencia opaca, pero aplicando un voltaje adecuado a las gotas de cristal líquido éste pueda actuar como un filtro selectivo (Gat, 2000).

- Filtros lineales variables (LVF, *Linear Variable Filters*): no pertenece al grupo de filtros ETF sino que se basa en un filtro de banda cuyo sustrato está recubierto por distintas capas dispuestas intencionadamente en una dirección. Cada capa tiene unas características específicas para dejar atravesar unas longitudes de onda u otras, actuando, por tanto, como un filtro. Las capas se disponen de forma alineada en el sustrato en una dirección determinada de modo que no todas ellas recubren toda la superficie en su totalidad (Figura 3.7), por lo que en un extremo del filtro las longitudes de onda que pueden atravesarlo son distintas de las que pasan en el extremo contrario (Dami et al., 2010). Así, al mover el filtro delante de la fuente de radiación se produciría una rápida separación de todas las longitudes de onda que pueden atravesarlo.

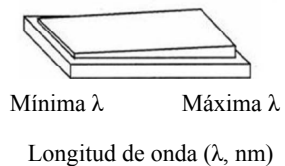


Figura 3.7. Esquema de un filtro lineal variable Adaptado de Dami et al. 2010.

- Filtros ópticos basados en sistemas micro-electro-mecánicos (*MEMS Tuneable Optical Filters*): estos sistemas ETF integran varios componentes mecánicos, electrónicos y eléctricos en un sustrato de silicio que puede variar en tamaño entre milímetros y micrómetros, lo que ha permitido reducir el tamaño de los instrumentos NIRS considerablemente al utilizarse técnicas fotolitográficas que permiten implementar sensores en un chip (Middelhoeck, 2000). Estos filtros

MEMS, modulables eléctricamente, no sólo se han usado para diseñar espectrofotómetros miniaturizados dispersivos (algunas marcas comerciales son MicroPhazirTM, TruProcessTM o AnavoTM) sino que se han incorporado en equipos interferométricos Fabry-Pérot o de Transformada de Fourier (Schuler et al., 2009). A continuación, se presenta una revisión más amplia de esos sistemas:

El diseño de espectrofotómetros que incorporan tecnología MEMS ha sido muy variado, desde interferómetros donde la señal es función del tiempo a otros “multiplex” que combinan tiempo y espacio (Schuler et al., 2009).

- Interferómetros Fabry-Pérot: estos han podido ser miniaturizados gracias al diseño de un actuador MEMS que controla la distancia (cavidad óptica) entre dos espejos reflectores planos y paralelos, donde uno es móvil y el otro fijo. Cuando se aplica un determinado voltaje entre dos electrodos al actuador MEMS, este induce un campo eléctrico que cambia el tamaño de la cavidad y, por tanto, el paso de longitudes de onda. La curvatura, inclinación y rugosidad de los espejos son imperfecciones que pueden tener un impacto en la exactitud del instrumento y deben ser controladas (Schuler et al., 2009).
- Equipos de Transformada de Fourier (FT): estos se basan en esta transformada matemática para convertir la señal en función del tiempo en función de la longitud de onda. Incorporan la tecnología MEMS junto con micro-óptica, en lo que se denomina MOEMS (*Micro-Opto-Electro-Mechanical Systems*). Básicamente, son micro-espejos (sistemas ópticos) acoplados a sistemas micro-mecánicos controlados electrónicamente que actúan como una red de difracción según el código temporal implementado. Estos equipos combinan las ventajas FT sin la necesidad de dividir el rayo incidente en varios haces, dado que los microelementos de la rejilla MEMS pueden moverse hacia arriba y abajo para generar el patrón de difracción (Schuler et al., 2009).

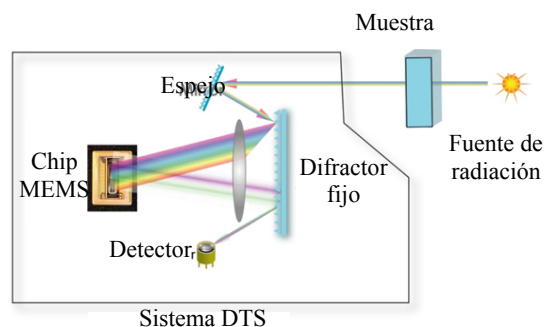


Figura 3.8. Esquema de un diseño instrumental post-dispersivo que incorpora tecnología MEMS. Adaptado de Geller, 2007.

- Equipos MEMS donde la señal es función del tiempo y del espacio. Esto se debe a que el diseño instrumental (Figura 3.8) incluye una red de difracción fija que separa espacialmente las longitudes de onda y un chip MEMS (Figura 3.9) que forma una red de microelementos de difracción (píxeles) controlados

eléctricamente, a donde llega cada longitud de onda (Senturia, 2008). En este caso, la técnica espectroscópica utiliza otra transformada DTS basado en el algoritmo de Hadamard para convertir la señal digital temporal en función de la longitud de onda.

Cada píxel (conjunto o red de microelementos difractores) puede bloquearse individualmente según un código temporal secuencial basada en el algoritmo de Hadamard (funciones simples binarias que utilizan valores +1 ó -1). De este modo, la transformada de Hadamard se utiliza para codificar una máscara que module los píxeles para que estos transmitan o no la luz sin pérdida de la misma y separen individualmente las distintas longitudes de onda.

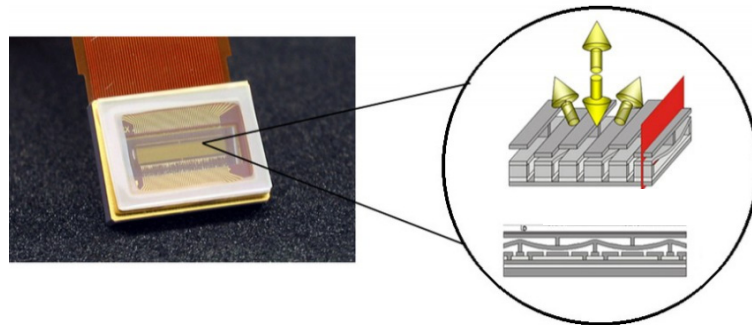


Figura 3.9. Rejilla de difracción basada en un sistema MEMS
(Senturia, 2008).

Aunque la aproximación más simple para medir el espectro en el rango completo puede ser bloquear todos los píxeles, excepto uno en cada momento, la intensidad de la señal recibida sería relativamente baja y, por tanto, con un bajo SNR (Geller, 2006). Debido a eso, la configuración que estos equipos emplean es un código temporal secuencial donde la mitad de los píxeles están activados y la otra mitad bloqueados, lo que permite que cada longitud de onda llegue al detector un 50 % de las veces cuando inciden en los píxeles activos, siendo, por tanto, más eficiente (Geller, 2007). Además, esta configuración permite detectar todas las longitudes de onda a la vez (configuración “multiplex”), lo que proporciona mayor rapidez de captura y mayor SNR. Este diseño es factible gracias al uso del algoritmo DTS de Hadamard que convierten la señal en función del tiempo, dada la secuencia temporal de activación/bloqueo de los píxeles, en información espectral (absorbancia frente a longitud de onda) (Day et al., 2005). El uso de DTS permite una serie de ventajas: uso de un sólo detector (menor coste), las posibles fuentes de ruido debido al uso de varios detectores son eliminadas, el detector es inherentemente insensible a la luz directa (sólo las longitudes de onda que tienen la secuencia adecuada proporcionada por los píxeles activos del chip MEMS llegan al detector contribuyendo a la señal final (Day et al., 2005)) y no existen partes móviles (Schuler et al., 2009). No obstante, suele haber un sacrificio en lo referente a rango espectral y resolución óptica. Además, al

requerir de elementos dispersivos a la entrada para definir la resolución del instrumento, la ventaja de Jaquinot (mejor SNR al haber pocos elementos ópticos) no puede ser considerada en instrumentos basados en el algoritmo Hadamard.

El reducido tamaño de estos equipos y su portabilidad no sólo es posible gracias a incorporar tecnología MEMS, sino a que la configuración óptica necesaria, fuente de radiación y energía requerida son suficientemente pequeñas para permitir que todos los elementos se incorporen en un equipo de reducidas dimensiones con suficiente autonomía para realizar las mediciones pertinentes.

Es importante considerar también los aspectos técnicos de calibración, estabilidad y fiabilidad de este tipo de instrumentos. Para ello, estos instrumentos deben incorporar procedimientos de corrección de posibles variaciones de la intensidad de la fuente de radiación, deben adaptarse a las diferentes condiciones de luz reflejada durante la adquisición de espectros según el tipo de muestra e implementar un estándar de calibración de longitudes de onda para prevenir cualquier desvío o error inducido. Las técnicas que se utilizan en la fabricación de chip MEMS han demostrado ser mecánicamente muy fiables (Senturia, 2008). La repetibilidad de un sensor MEMS radica en que mientras el voltaje aplicado al mismo sea repetible, todas las demás etapas (activación/bloqueo de píxeles, modulación de los mismos, DTS) serán repetibles y se podrá tener seguridad en la calibración final de la longitud de onda asignada a cada píxel (Senturia, 2008).

El instrumento NIRS portátil basado en tecnología MEMS y evaluado en esta tesis doctoral para el análisis *in situ* en la industria del cerdo ibérico fue diseñado y comercializado inicialmente por Polychromix Inc. Hace un par de años, Thermo Fisher Scientific Inc. adquirió dicha empresa y actualmente comercializa un equipo MEMS-NIRS de

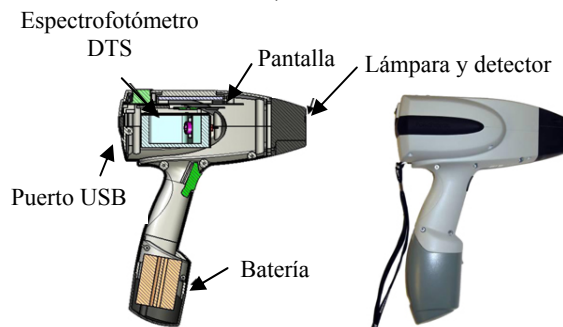


Figura 3.10. Características de diseño del instrumento Phazir™

Adaptado de Geller, 2007.

reflectancia basado en este concepto: una red de difracción fija y un chip MEMS programable que actúa como filtro espectral, bajo la denominación MicroPhazir™⁶ (versión actualizada y más reducida de Phazir™ (Figura 3.10)). Este instrumento compacto, robusto y portátil consta de una lámpara de tungsteno incandescente y un único detector InGaAs de amplio espectro, lo que permite que sea un instrumento de bajo coste con un consumo energético

⁶ <http://www.ahurascientific.com/material-verification/products/microphazirrx/index.php>

muy eficiente y una adecuada respuesta espectral. MicroPhazirTM consta del mismo diseño instrumental que PhazirTM, pero con algunas diferencias como son: menor tamaño y peso, consta de referencia interna, tiene una ventana de protección de la fibra óptica y pantalla trasera de información. Ambos cuentan con un microprocesador integrado y pantalla para interactuar con el usuario. Las características más relevantes son rapidez de análisis (tiempo de integración de 600 ms), ligereza y que incorpora un microprocesador. Además, esta empresa ha lanzado al mercado, en noviembre del año 2012, otro espectrofotómetro basado en la misma aplicación de la tecnología MEMS, denominado TruProcessTM ⁷. Este espectrofotómetro es muy similar a los anteriormente citados, aunque se diferencia en que permite realizar análisis de reflectancia sin la necesidad de estar en contacto con la superficie de la muestra (distancia óptima entre 35 y 50 mm, aunque con un máximo de 100 mm) de forma automatizada. El área de muestreo de este instrumento es superior a la de los equipos PhazirTM y MicroPhazirTM (0,8 x 1 cm) con un diámetro de 2,5 cm y un área de muestreo que puede llegar a los 5 cm según la distancia de trabajo. Además, incluye un emisor inalámbrico que permite la comunicación con otros dispositivos.

Axsun Technologies Inc. también ha diseñado un instrumento portátil (AnavoTM ⁸) de reducido tamaño y compacto con un chip MEMS como filtro espectral y un láser modulable como fuente de radiación (Optoelectronic, 2007). Esta es la principal diferencia con los equipos MEMS anteriores, ya que el uso de esta fuente de radiación tiene diversos impactos: mayor precisión y exactitud en la selección de longitudes de onda, mayor precio, menor duración de la batería o vida de la lámpara y menor rango espectral. Además, hay que tener en cuenta el riesgo que puede tener para el operador trabajar con un equipo cuya fuente de luz es un láser.

La implantación de sistemas micro-electro-mecánicos (MEMS) ha sido la mejora más significativa en los últimos años en cuanto al diseño de espectrofotómetros NIR portátiles, prácticos, de bajo coste y robustos (Spectroscopy, 2010). Esta tecnología MEMS-NIRS tuvo sus primeras incursiones en la industria de los polímeros y del plástico y, más recientemente, en la inspección de productos farmacéuticos. Ahora hay un gran interés por diversificar las aplicaciones y la industria agroalimentaria está tomando un papel más importante en el mercado de estos espectrofotómetros NIR portátiles. De hecho, se estima que pueden ocupar alrededor del 34 % de la demanda de instrumentación NIRS (Spectroscopy, 2010). No en vano, el número de publicaciones donde se evalúa el potencial de estos instrumentos MEMS-NIRS en aplicaciones agroalimentarias está aumentando en los últimos años (Frutas: Pérez-Marín et al., 2009b; Pérez-Marín et al., 2010b, 2011;

⁷ <http://www.ahurascientific.com/material-verification/products/truprocess/index.php>

⁸ <http://www.axsun.com/products/anavo-handheld-analyzer.php>

Sánchez et al., 2011, 2012a, 2012b; Fernández-Navales et al., 2011. Piensos compuestos: Fernández-Pierna et al., 2010. Carne de cerdo: Prado et al., 2011).

No obstante, no sólo la tecnología MEMS ha permitido la miniaturización de los equipos NIRS, sino que otros avances en relación a las fuentes de radiación, detectores y hardware/software han permitido la reducción del tamaño de los instrumentos y mejora en cuestiones relativas al consumo energético, seguridad y de uso amigable de los equipos para el usuario.

Si bien los equipos MEMS-NIRS han tenido un gran auge en los últimos años, estos no han sido los únicos equipos portátiles que han aparecido en el mercado en los últimos años. Como se ha descrito anteriormente, los filtros lineales variables son unos filtros de banda dispuestos sobre un sustrato que permiten controlar la dispersión de la radiación. Basándose en esta tecnología, la empresa JDSU Uniphase Corporation ha desarrollado, recientemente, un equipo, denominado MicroNIR^{TM9}, ultracompacto, ligero y de muy bajo coste. Como se ha explicado anteriormente, este tipo de filtros se basan en el revestimiento no lineal de una superficie que actúa como filtro específico no uniforme para unas determinadas longitudes de onda a lo largo de toda la superficie. Este equipo integra dos fuente de luz (lámparas de tungsteno incandescente), LVF y un fotodiodo detector InGaAs en un diámetro de apenas 4,5 cm, por lo que tiene un reducido tamaño de ventana de muestreo. Además, no consta de microprocesador y requiere de un equipo externo de procesador de datos. No obstante, el tiempo de integración es muy reducido (0,1 ms) y tiene un tamaño y peso muy reducido.

La empresa Analytical Spectra Device Inc. también ha lanzado recientemente al mercado un espectroradiómetro portátil de reducido tamaño y ligero, llamado comercialmente Handheld2^{TM 10}. Este equipo cuenta con un láser como fuente de luz y una red de diodos de alta sensibilidad para medir en reflectancia. No obstante, el rango de longitudes de onda de trabajo del equipo está principalmente en el espectro visible (325-1.075 nm, con una resolución de 3 nm).

Aparte de estos equipos comerciales portátiles de reducido tamaño, existen en el mercado muchos componentes que han permitido miniaturizar los equipos NIRS. La red de diodos emisores (LEDs) ha sido un avance interesante en fuentes de radiación debido a sus características de bajo consumo energético, precio (entre 15-76 €, según el pico de emisión), reducido tamaño y larga duración (≥ 20.000 horas). Estas fuentes de radiación, de hecho, ya fueron utilizadas en el primer equipo NIRS comercial para el

⁹ <http://www.jdsu.com/en-us/Custom-Optics/Products/a-z-product-list/Pages/miniature-near-infrared-Spectrometer.aspx>

¹⁰ <http://www.asdi.com/products/fieldspec-spectroradiometers/handheld-2-portable-spectroradiometer>

análisis de semillas intactas en 1985 (McClure et al., 2002). No obstante, las fuentes LEDs tienen sus limitaciones: cambios de intensidad de la radiación según la temperatura de trabajo, además de haber una degradación gradual de la misma con el paso del tiempo (Malinen et al., 1998). También, el rango de longitudes de onda que emiten es muy estrecho (30-50 nm) alrededor de la longitud de onda central del diodo. No obstante, es factible montar diversos LEDs en una red si el rango necesario a cubrir es más amplio, aunque esta opción no sea muy económica (Esteve y Hurburgh, 2009). Otras fuentes de luz que han permitido notables avances en el diseño de instrumentos NIRS han sido los diodos láseres modulables, también denominados diodos emisores de luz superluminiscentes (SLED, *Superluminescent Light-Emitting Diodes*). Estos proporcionan una excelente resolución espectral y menor ruido; además, son más baratos y pequeños que los láseres modulables tradicionales.

Avances en hardware y software han permitido mejoras en la rapidez y precisión en la toma de datos espectrales y en el tratamiento matemático de los mismos al implementar el concepto de “*plug and play*” (configuración automática de los dispositivos al conectarlos) en la instrumentación NIRS, lo que facilita su uso por parte de los usuarios. Por lo tanto, la tecnología NIRS ha evolucionado hacia la simplificación de cara a los usuarios, aunque se trabajen con instrumentos cada vez más sofisticados. La miniaturización de los procesadores también ha permitido mayor independencia de los equipos, así como el uso de tecnologías de la comunicación e información remota (ICT, *Information and Communication Technologies*) como Sistemas Universales de Telecomunicaciones Móviles (UMTS, *Universal Mobile Telecommunications Systems*), tecnologías de radio frecuencia (ejemplo: Bluetooth) o comunicaciones sin cables (“*wireless*” como Wi-Fi).

No obstante, hay que tener en cuenta que es beneficioso reducir el tamaño de los sensores en tanto en cuanto el ratio entre la señal y el ruido (SNR) del equipo sea adecuado para el éxito de la aplicación (Tadigadapa y Mateki, 2009). Por lo que es necesaria la evaluación de éstos en función de la aplicación que se quiera desarrollar para analizar su reproducibilidad, exactitud, precisión y adaptabilidad.

Otro aspecto que en los últimos años se está abordando, se refiere a la problemática que desde sus inicios la tecnología NIRS ha acarreado en relación a la falta de estandarización en cuanto a los formatos de los datos obtenidos de cada instrumento. Generalmente, cada instrumento cuenta con un software específico de adquisición y tratamiento de los datos espectrales, que en muchas ocasiones no permite una simple y fácil transferencia/exportación de los datos a otros dispositivos o programas informáticos. No obstante, algunas versiones recientes de determinados software (por ejemplo, UniStarTM o The Unscrambler[®]) permiten una cierta compatibilidad de trabajo con datos procedentes de distintos instrumentos. Además, el uso cada vez más generalizado de entornos de programación complejos, como MATLAB[®],

permite el diseño de programas informáticos, rutinas y/o algoritmos para el tratamiento de datos espectrales independientemente del instrumento utilizado para la adquisición de éstos.

3.3.3. Interacción entre radiación NIR y tejidos biológicos

Como se ha expuesto anteriormente, una de las ventajas que siempre se mencionan de la tecnología NIRS es la posibilidad de realizar medidas no destructivas y no invasivas. Esto conlleva múltiples ventajas frente a otras técnicas analíticas, pero su implantación en el análisis de productos intactos no es una tarea sencilla.

En la literatura se observa normalmente que cuando la aplicación NIRS se basa en el análisis del tejido intacto, la capacidad predictiva de los modelos se ve comprometida. Parte de esta pérdida de predicción y exactitud puede deberse a la menor capacidad de los instrumentos utilizados (generalmente de fibra óptica) en relación a los monocromadores de altas prestaciones utilizados con producto fundido, molido o picado. Pero, asimismo, otra razón importante puede ser la mayor complejidad de la matriz de la muestra analizada en comparación con la muestra molida, picada o fundida. La presencia de capas superficiales, como la piel o de otros tejidos estructurados por capas, hace que haya efectos dispersivos que afecten a las medidas ópticas/espectroscópicas y limiten el desarrollo posterior de modelos predictivos. Si bien los tejidos biológicos se caracterizan por ser bastantes transparentes a la región espectral del infrarrojo cercano (NIR), especialmente en el rango 780-900 nm o incluso hasta las 1.500 nm, ya que no contienen muchos cromóforos que absorban en estas longitudes de ondas (Tuchin, 2007), si sufren procesos de dispersión. Estos procesos de dispersión de la luz hacen que la modelización de la propagación de luz a través de capas como la epidermis sea un reto complejo.

La absorción en el rango espectral NIR se debe a propiedades físico-químicas de los materiales (sección 3.3.1.), pero la dispersión de la luz está relacionada con las características estructurales/texturales de los tejidos analizados, tanto a nivel micro como macroscópico. Por eso, medidas de reflectancia o transmitancia están directamente relacionadas con el comportamiento dispersivo y de absorción del tejido analizado.

La radiación tiene que atravesar la piel (pelo, pigmentación, etc.) y eso influye en la medida (Pringle et al., 1999). Recientemente, Sørensen et al. (2012) evaluaron un equipo NIRS que recoge espectros en transmisión de forma continua a medida que profundiza en la canal desde la epidermis hasta el músculo, atravesando la grasa subcutánea, mostrando diferencias espectrales tanto visuales como matemáticas en función de la distancia a la superficie. Estos resultados también fueron observados al usar otra técnica espectroscópica vibracional como Raman (Lyndgaard et al., 2011). Mitchell et al. (2005) indicaron que los cambios en composición adiposa pueden ser

detectados a una profundidad aproximada de 1 cm a partir de medidas NIRS en tejidos seccionados y reconstruidos para el rango 700-1.100 nm.

Según la ley de Beer-Lambert, un incremento en los valores de absorbancia se correspondería con un aumento de la concentración del parámetro que se mide, pero esto no se corresponde con la realidad ya que las medidas de transmisión colimada o reflectancia proporcionan información sobre la luz atenuada causada tanto por los fenómenos de absorción como de dispersión. Como resultado, un cambio en las propiedades de dispersión de un producto afectaría a la atenuación de la luz y, por tanto, según la ley anterior, podría ser malinterpretado como un cambio en la composición (Aernouts et al., 2011). Esto en parte explica los mayores errores obtenidos en los modelos *in vivo* o no-destructivo de productos intactos, ya que existen capas que interactúan con la luz, pero sin aportar información estrictamente relacionada con la composición físico-química de interés para desarrollar los modelos, aunque bien es cierto que existen estrategias de corrección espectral para mitigar estos efectos (sección 3.3.3). Conocer la propagación de la luz en el tejido porcino y sus propiedades ópticas, por lo tanto, es imprescindible para profundizar en la optimización de la adquisición de espectros de alta calidad y que contengan información útil cuando se realizan estudios sobre productos intactos de forma no destructiva, donde hay una estructura multicapa antes de la zona de interés, o en medidas *in vivo*. Para ello, no es sólo importante caracterizar ópticamente (coeficiente de absorción, coeficiente de dispersión, factor anisotrópico e índice de refracción) el tejido cutáneo (dermis y epidermis), sino conocer las propiedades y características del tejido adiposo (hipodermis), lo cual también sería interesante para aplicaciones donde el interés radica en medir de forma no destructiva grasa subcutánea. Estos parámetros sirven para describir la propagación de la luz en tejidos biológicos, ya que la luz puede considerarse como una fuente de fotones por unidad de tiempo y volumen que son emitidos a una localización específica. Posteriormente, esos fotones al incidir sobre el tejido sufren distintas trayectorias determinadas por esas propiedades ópticas de absorción y dispersión de las distintas capas.

Para poder abordar el estudio sobre la interacción entre la radiación NIR y el tejido intacto, ya sea directamente sobre la capa de interés o sobre la piel, es importante conocer las características físicas, estructurales, químicas y ópticas de las distintas capas que conforman el tejido cutáneo y subcutáneo porcino.

El tejido cutáneo y subcutáneo porcino se caracteriza por tres capas principales con distintas estructuras: epidermis (tejido libre de vasos capilares), dermis (capa vascularizada con una densidad irregular de tejido conectivo con fibras de colágeno) e hipodermis (tejido adiposo compuesto por dos subcapas separadas con una delgada capa de tejido conectivo; en esta tesis muchas veces se ha referido a ella como grasa subcutánea). Renaudeau et al. (2006) usaron un sistema de imágenes digitales para medir el espesor de las capas cutáneas de cerdos creole, cruce entre porcino ibérico y asiático (Lemus-

Flores et al., 2001), mostrando un espesor medio de la epidermis de 55 μm y 3,82 mm para la dermis. El espesor de la hipodermis o tejido subcutáneo adiposo depende de la zona corporal de muestreo, como indica Mowafy y Gassens (1975). Este tejido adiposo se caracteriza por la agregación de células adiposas que almacenan una o varias gotas de grasas en cada una. De forma general, el tejido cutáneo porcino es un medio no homogéneo (tanto horizontalmente como verticalmente) compuesto por variedad de células con distintas características y estructuradas en distintas capas.

Una vez descrita la estructura del tejido cutáneo porcino, es necesario entender como interacciona la luz a través de estas estructuras. Para ello, es necesario conocer las propiedades ópticas (dispersión y absorción) de los tejidos y los algoritmos matemáticos empleados para calcular y describir la propagación de la luz a través de tejidos biológicos. A continuación se detallan las bases teóricas necesarias para el correcto entendimiento de los resultados obtenidos en esta tesis doctoral.

La radiación está compuesta por fotones que se propagan en múltiples trayectorias determinadas por interacciones de dispersión y absorción con el tejido o material. Estos fenómenos determinan el número de fotones que viajan entre dos puntos. Un tejido biológico está formado por multitud de componentes (células, vacuolas, orgánulos, etc.) que desde el punto de vista macroscópico constituyen un medio complejo formado por distintas estructuras de diversas formas (heterogéneo), del que es necesario asumir algunos supuestos para poder obtener resultados y modelos aproximados. En general, los modelos de simulación de propagación de la luz en tejido biológicos asumen que, teóricamente, la distribución de los centros de dispersión y absorción es uniforme a lo largo de todo la estructura (Tuchin, 2007).

Para poder avanzar en esta revisión es necesario exponer algunos conceptos básicos referentes a la terminología utilizada en este ámbito. Se entiende como dispersión (*scattering*) al fenómeno que produce una desviación de fotones en nuevas direcciones de propagación, es decir, hay un cambio de dirección dentro de un medio, pero sin cambiar la energía (longitud de onda o frecuencia) asociada a ellos. Los fenómenos de absorción se refieren a la desaparición de fotones y al final de sus trayectorias, ya que se produce una transferencia de energía a las moléculas del tejido (Martelli, 2012). Si bien los fenómenos de dispersión dominan el movimiento de los fotones en el tejido biológico y están relacionados con la estructura del mismo (heterogeneidad inter-intracelulares), la información fisiológica está relacionada con los fenómenos de absorción. La caracterización de estos fenómenos, mediante el coeficiente de absorción (μ_a) y dispersión (μ_s), nos proporciona información sobre las propiedades ópticas del tejido y, por tanto, de sus características químicas y físicas.

- Coeficiente de extinción (μ_t): coeficiente de interacción o atenuación total que describe la atenuación debida a los fenómenos de absorción y dispersión.

$$\mu_t = \rho_s \sigma_{\text{ext}}$$

donde ρ_s se corresponde con la densidad de partículas y σ_{ext} con la extinción media de la sección transversal por partícula ($\sigma_{\text{ext}} = \sigma_{\text{sca}} + \sigma_{\text{abs}}$). Se puede considerar $\mu_t = \mu_a + \mu_s$ para medios donde predominen los fenómenos de absorción frente a los de dispersión, es decir, $\mu_a \gg \mu_s$ (mm^{-1} o cm^{-1}).

- Coeficiente de dispersión (μ_s): $\mu_s = \rho_s \sigma_{\text{sca}}$ (mm^{-1} o cm^{-1}); ratio entre la energía dispersada por unidad de volumen y la energía incidente por unidad de área. Se define también como la probabilidad de que un fotón sea dispersado en un medio (número de eventos de dispersión) por unidad de longitud. Las características de dispersión de una muestra están principalmente determinadas por el tamaño de las partículas moleculares (*scatters*) en comparación con la longitud de onda incidente y el índice de refracción (n) entre las partículas y el medio que las contiene.
- Coeficiente de absorción (μ_a): $\mu_a = \rho_s \sigma_{\text{abs}}$ (mm^{-1} o cm^{-1}), ratio entre la energía absorbida por unidad de volumen y energía incidente por unidad de área. Se define como la inversa de la distancia media que viaja un fotón antes de ser absorbido o la probabilidad de que un fotón sea absorbido en un medio (número de eventos de absorción) por unidad de longitud.
- Albedo (Λ): probabilidad de que un fotón incidente en un pequeño elemento de volumen pueda sobrevivir $\Lambda = \mu_s / \mu_t$.
- Función fase de dispersión ($p(\bar{s}, \bar{s}')$ o $p(\theta)$): describe las propiedades dispersivas del medio siendo la función de densidad probabilística de que un fotón sea dispersado en una dirección \bar{s}' tras un evento de dispersión, viajando inicialmente en la dirección \bar{s} . Existen distintas fórmulas para describir esta función: *Henyey-Greenstein phase function* (HGPF), *Gegenbauer Kernel phase function* (GKPF), la teoría Mie (para estructuras moleculares esféricas cuyo tamaño coincida con la longitud de onda del fotón) o también se puede calcular experimentalmente mediante la utilización de un goniómetro (Figura 3.15). En la práctica, la función de dispersión más utilizada por su simplicidad y haber demostrado ser útil para aproximar la dependencia angular de un proceso de dispersión en tejidos biológicos, aunque originalmente fue empleada para imitar la dependencia angular de la dispersión de la luz cuando esta interactúa con pequeñas partículas en la galaxia (Henyey y Greenstein, 1941), es la función HGPF:

$$p(\theta) = \frac{1}{4\pi} \frac{1 - g^2}{(1 \pm 2g^2 \cos \theta)^{3/2}}$$

ó una vez normalizada

$$p(\cos\theta) = \frac{1 - g^2}{2(1 \pm 2g^2 \cos \theta)^{3/2}}$$

donde g es el factor de anisotropía (coseno medio del ángulo de dispersión, θ). El valor de g puede variar entre -1 y 1, siendo $g = 0$ cuando hay una dispersión uniforme en todas las direcciones (isotrópico), $g > 0$ domina la dispersión hacia adelante (grandes partículas) y $g < 0$ domina la dispersión hacia atrás. En tejidos biológicos, los valores de g suelen encontrarse $0,7 \leq g < 1$ (Cheong et al., 1990). En caso de que no se pueda obtener medidas ópticas para poder determinar este parámetro, normalmente, se utiliza un valor aproximado de $g = 0,9$ en el rango visible y NIR para tejidos biológicos (Tuchin, 2007).

- Coeficiente de dispersión reducido (μ'_s): $\mu'_s = (1-g)\mu_s$ (mm^{-1} o cm^{-1}); es el parámetro más frecuente para describir las propiedades dispersivas de regímenes altamente difusivos ($\mu_a \ll \mu_s$). Se define como la inversa de la distancia media viajada por los fotones a lo largo de la dirección de propagación inicial antes de que cambien de trayectoria o la probabilidad de que un fotón sea dispersado en un medio de forma aleatoria por unidad de longitud
- Índice de refracción (n): es el ratio entre la velocidad de la luz en el vacío y la velocidad de la luz en el medio. Ocurren fenómenos de refracción cuando la luz incide en la frontera de dos medios con diferentes índices de refracción, estos fenómenos están gobernados por la ley de Snell:

$$v_1 \sin \theta_1 = v_2 \sin \theta_2$$

En la mayoría de los tejidos biológicos, el valor medio que tiene el índice de refracción es de 1,4 (Duck, 1990).

Un resumen más amplio de todas las propiedades ópticas que se pueden definir mediante índices sintéticos puede encontrarse en Yamada (1995).

Los tejidos biológicos se caracterizan por ser medios altamente dispersivos o difusos ($\mu_s \gg \mu_a$) dada las diferencias entre índices de refracción, falta de homogeneidad en el tamaño de componentes y estructuras moleculares/celulares. Por lo tanto, la propagación de la radiación NIR en tejidos biológicos está dominada por eventos de dispersión y es altamente difusa.

Una vez expuestos estos conceptos, se puede hacer hincapié en la modelización de la propagación de la luz (fotones). La propagación de los

fotones en un tejido biológico (medio dispersivo) suele ser estudiada mediante la teoría de transferencia radiativa (RTE, *Radiative Transfer Equation*). Ésta se fundamenta en una ecuación integral-diferencial compleja que representa el balance de energía de la propagación de la luz a través de elementos de volumen de un medio absorbente y dispersivo a una macroescala determinada (Martelli, 2012). Esta ecuación describe los cambios en el flujo de energía entrante, saliente, absorbida y emitida dentro de un volumen infinitesimal. No obstante, existen otras aproximaciones analíticas como las ecuaciones de Maxwell que también permiten describir la propagación de la luz, aunque en tejidos biológicos, debido a su heterogeneidad, no son utilizadas (Cheong et al., 1990).

La RTE no da una solución rigurosamente real, pero es útil para muchos problemas prácticos. No obstante, las soluciones analíticas de RTE requieren de métodos numéricos complejos que necesitan de una gran cantidad de memoria y tiempo computacional, por lo que son sólo factibles para casos simples e idealistas. Debido a esa complejidad de la ecuación que cuenta con hasta 6 variables independientes a determinar, se utilizan otras posibles aproximaciones. Cheong et al. (1990) hace una revisión de las distintas aproximaciones matemáticas que existen para proporcionar una solución de la ecuación de transferencia radiativa: modelos de transmisión no-dispersiva, flujo asintótico, teoría o ecuación de difusión, teoría de Kubelka-Munk (asume condiciones que no siempre se cumplen en la realidad y, por eso, tiene una limitada precisión y capacidad para predecir el comportamiento del tejido; no obstante, ya que relaciona directamente los coeficientes de absorción y dispersión con las medidas de reflexión y transmisión hace que se utilice para una primera aproximación) o simulación por Monte Carlo (MC).

La teoría o ecuación de difusión (DE, *Diffusion Equation*) es una aproximación obtenida de la RTE por integración, teniendo en cuenta algunos supuestos para geometrías como las que constituyen los tejidos biológicos (Martelli, 2012). Los supuestos a considerar son: 1) la radiación en el interior del medio difuso sufre una dispersión casi isotrópica y 2) la variación temporal del vector flujo a lo largo del tiempo es despreciable con respecto al vector en sí mismo. Aunque esta aproximación es útil, los resultados se deterioran si el medio no es altamente dispersivo ($\mu_s \gg \mu_a$) y no es ópticamente grueso.

La DE puede describir cuantitativamente, de una forma suficientemente precisa, la migración de los fotones en un medio difuso si se conocen los coeficientes de absorción (μ_a) y de dispersión reducido (μ'_s). Por tanto, no es necesario conocer la función de dispersión, sino sólo el factor anisotrópico, g .

$$\frac{\partial U(\mathbf{r}, t)}{\partial t} = \frac{v}{3(\mu'_s + \mu_a)} \nabla^2 U(\mathbf{r}, t) - v\mu_a U(\mathbf{r}, t) + S_o(\mathbf{r}, t)$$

donde v es la velocidad de la luz en el tejido y S_o se refiere a una fuente simétrica esférica.

Otra aproximación, distinta del empleo de métodos numéricos para solucionar RTE, es el empleo de métodos estadísticos como el método Monte Carlo (MC), colección de funciones computacionales, que permite simular, de una forma más real y rigurosa, la propagación física de los fotones en medios dispersivos tras calcular numerosas posibles trayectorias de forma aleatoria. Este método se basa en RTE e incluye la simulación computarizada de la transferencia de los fotones en el tejido expresado como distribuciones probabilísticas basadas en la geometría y propiedades ópticas del medio (Prah et al., 1989). No obstante, MC puede considerarse también como un método numérico para solucionar RTE y modelar por simulación la propagación de la luz. MC es considerado, hoy en día, como un método flexible y fiable para predecir el flujo de luz para un amplio rango de parámetros ópticos y condiciones. Este método básicamente simula el transporte de la luz en el tejido enviando un paquete de fotones por una trayectoria aleatoria a través de una muestra de tejido recreada virtualmente, tal y como se muestra en la Figura 3.11.

Existe un algoritmo basado en Monte Carlo de dominio público (*Monte Carlo Multi-Layered*, MCML), desarrollado en un primera etapa por Wang y Jacques (1992), y que es ampliamente utilizado en este ámbito¹¹. Dicho algoritmo describe el transporte de un rayo estrecho de fotones infinito que incide perpendicularmente en un tejido multi-capa.

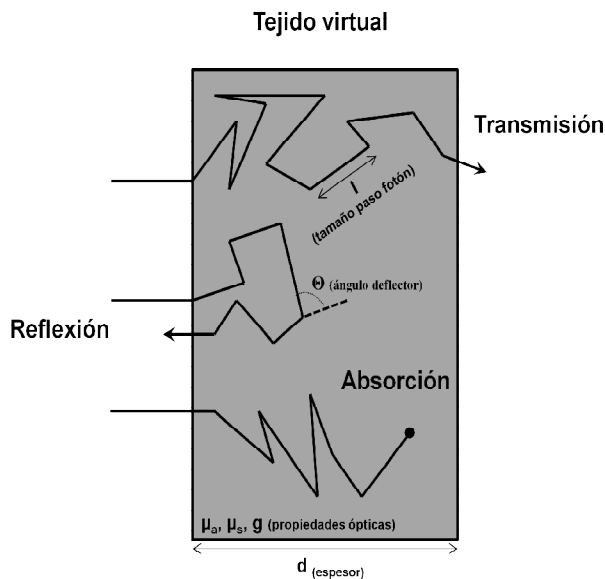


Figura 3.11. Posibles trayectorias aleatorias simuladas por Monte Carlo para un fotón viajando en un tejido. Adaptado de Wang y Jacques, 1992.

¹¹ <http://omlc.ogi.edu/software/mc>

Las etapas básicas de este algoritmo basado en simulación por Monte Carlo son:

1.- Un fotón con un peso (W) incide en la superficie de la capa del tejido (punto definido por tres coordenadas: x , y , z) con un ángulo determinado definido por θ y Φ .

2.- El fotón tiene un peso inicial W_0 que es reducido en una cantidad equivalente a la reflejada en la superficie.

3.- Una nueva dirección del fotón es calculada estadísticamente según la función de fase de dispersión (normalmente es utilizada la función HGPF) y teniendo en cuenta el ángulo de incidencia y el índice de refracción de la capa.

4.- Se calcula un tamaño de paso del fotón (*photon step size*, l) definido como:

$$l = - \frac{\ln(\varepsilon)}{\mu_t}$$

donde ε es un número generado aleatoriamente entre 0 y 1 y μ_t es el coeficiente de atenuación total.

5.- El peso del fotón es nuevamente reducido, debido a la absorción de la capa, según la fórmula:

$$\Delta W = W \frac{\mu_a}{\mu_t}$$

donde W se corresponde con el peso en la fase 2.

6.- Un número aleatorio, 0 ó 1, es generado para determinar si el fotón es dispersado o no. Si el número es 0 entonces éste no sufre dispersión y se procede a repetir el paso 3. Para valores de 1, el fotón es dispersado.

7.- Una nueva dirección del fotón dispersado es calculada estadísticamente según la función de fase de dispersión.

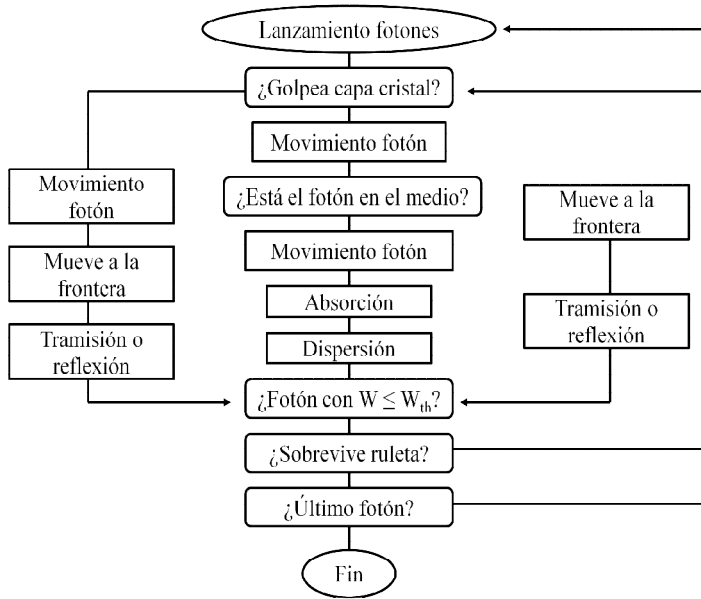


Figura 3.12. Diagrama de flujo seguida por la simulación Monte Carlo de la propagación de la luz en tejidos multi-capas. (se ha supuesto una capa de cristal, que no absorbe ni dispersa, en caso de que la muestra se coloque en un porta-muestras). Adaptado de Wang y Jacques, 1992.

Los pasos del 3 al 6 son repetidos para el número de fotones deseados. Si la simulación se basa en una estructura multicapa más compleja, el proceso vuelve al paso 1 cuando una nueva capa es alcanzada por los fotones, pero usando los nuevos parámetros ópticos para esa capa (Wang y Jacques, 1992; Wang et al., 1995).

Hay que tener en cuenta que cuando los fotones llegan al extremo de una capa para dejar el medio, parte de su peso es transmitido (probabilidad de reflexión interna) según las ecuaciones de Fresnel (describen el comportamiento de la luz entre medios con distintos índices de refracción). Ese peso transmitido a través de la frontera es añadido a la reflectancia o transmitancia y, dado que el ángulo de refracción es determinado por la ley de Snell, la distribución angular saliente puede ser calculada. Los fotones con su peso restante son reflejados y continúan su camino aleatorio. Cuando el peso del paquete es menor a un límite establecido (W_{th}) previamente (normalmente se usa 10^{-4} , Tuchin (2007)), el fotón puede ser finalizado ($W = 0$) o no usando un procedimiento de “ruleta rusa”. Esta última fase permite salvar tiempo computacional, ya que no tiene sentido continuar con el camino del fotón si no contribuye esencialmente a la señal luego detectada. La Figura 3.12 esquematiza las fases de la simulación MC en tejidos multicapas.

Este método tiene varias ventajas: considera las no coincidencias entre la superficie del medio, el cristal y aire, las pérdidas de luz por los extremos de la

muestra y la función de fase implementada puede ser la que elija el usuario. La única limitación es que el tiempo de cálculo requerido para asegurar una adecuada convergencia estadística es alto, ya que el número de fotones en la simulación debe ser superior de 100.000 para obtener resultados robustos (Wang y Jacques, 1992). Hay que tener en cuenta que las simulaciones MC se basan en propiedades ópticas macroscópicas, por tanto, asumen la uniformidad de todo el volumen del tejido, por lo menos cuando se utiliza el algoritmo MCML anteriormente citado.

Para desarrollar estas simulaciones, es decir, obtener un modelo de propagación de la luz en el tejido, lo que se traduce en una solución numérica de las ecuaciones de transporte y en unos parámetros de salida como reflectancia difusa y transmitancia de la muestra, es necesario conocer previamente la geometría de la muestra y sus propiedades ópticas. Si el medio está estructurado en capas, caso típico de tejidos biológicos, es necesario caracterizar cada capa (i) con los siguientes parámetros: μ_{ai} , μ'_{si} (o en su defecto: μ_{si} y g o $p_i(\theta)$), el espesor (d_i), e índice de refracción del medio (n_i). También es necesario conocer el índice de refracción del medio externo e interno (si existe). No obstante, el problema que nos encontramos normalmente es el contrario. Medir la transmitancia y reflectancia de un tejido es posible y sencillo, mientras que esta no es la situación para las propiedades ópticas.

Existen distintas metodologías para determinar esas propiedades ópticas, normalmente basados en soluciones de la RTE. Estas pueden clasificarse en métodos directos - imponen restricciones estrictas sobre la muestra para que coincida con las hipótesis formuladas y así obtener una solución exacta - o indirectos - utilizan menos restricciones para modelar la muestra. Los métodos indirectos, a su vez, se pueden clasificar en: no-iterativos como los modelos basados en la ley de Beer-Lambert, que no son apropiados para medios difusos, y los modelos de Kubelka-Munk (KMM) (modelo simplificado de transferencia radiativa, ya que asume que el flujo óptico, que se propaga en la misma dirección que el rayo incidente, decrece por los eventos de absorción y dispersión y se incrementa por los fenómenos de dispersión de vuelta) e iterativos donde las propiedades ópticas son calculadas iterativamente hasta que se aproximan a los valores de reflexión y transmisión medidos como en el caso de los algoritmos *Inverse Adding-Doubling* (IAD) o *Inverse Monte Carlo* (IMC). Los utilizados más frecuentemente en la literatura se refieren a los métodos iterativos indirectos, concretamente IAD.

Las medidas experimentales necesarias para poder calcular los parámetros ópticos de un material (μ_a , μ'_s) mediante el empleo de algunos de esos algoritmos iterativos inversos son:

- Transmisión total (T_t) para una radiación colimada (rayos paralelos entre sí) o difusa.

- Reflectancia total (R_t) para una radiación colimada o difusa.
- Absorción de la muestra colocada en una esfera integradora.
- Transmisión colimada o no dispersiva (T_c) de una radiación colimada
- Distribución angular de la luz emitida desde una muestra irradiada.

Típicamente, midiendo R_t y T_t es suficiente, suponiendo un valor para g o estimando una variación del mismo (Saeys et al., 2008), para determinar los parámetros ópticos de un material en cuanto al coeficiente de absorción y de dispersión reducido. Si, además, se dispone de medidas T_c o de la función de fase se puede obviar la suposición del factor de anisotropía y determinar unívocamente los parámetros μ_a , μ_s y g (Tuchin, 2007). Para ello, es necesario el empleo de métodos iterativos inversos como IAD o IMC. Hay que tener en cuenta que las propiedades ópticas dependen del rango de longitudes de onda considerado, por lo que las medidas anteriores se deben realizar para todo el rango de interés.

Una de las técnicas instrumentales con mayor recorrido para medir R_t y T_t se basa en la utilización de esferas integradoras (IS, *Integrating Sphere*). Su empleo se fundamenta en la medición precisa de los flujos reflejados, ya que se caracterizan por tener una forma interna esférica con una superficie recubierta por un material altamente reflectante (Hanssen y Snail, 2002). Por lo tanto, la luz que incide en cualquier parte de la esfera es inmediatamente distribuida uniformemente por toda su superficie. Un detector colocado en esa superficie siempre recibirá un flujo que es directamente proporcional a la luz incidente en la esfera, independientemente de su localización. La Figura 3.13 muestra un esquema de los tipos de esferas integradoras que existen: simples (Figura 3.13a) y dobles (Figura 3.13b). Una esfera integradora simple consta de una sola esfera cuya configuración permite medir un parámetro (R_t o T_t) a la vez; mientras una configuración doble consta de dos esferas integradoras donde se dispone la muestra de forma que se obtienen simultáneamente ambos parámetros (R_t y T_t) (Pickering et al., 1993). Esta última configuración es menos común y más cara, aunque es preferible ya que permite reducir errores producidos por mover la muestra para realizar una u otra medida al medir reflexión y transmitancia simultáneamente, y en caso de que las propiedades ópticas cambien dinámicamente por posibles degradaciones a lo largo del tiempo, éstas son obviadas (Tuchin, 2007; Prahl, 2010). Equipos de doble esfera integradora (DIS, *Double Integrating Spheres*) están considerados como el método “estándar” para el análisis *in vitro* de medidas relacionadas con la obtención de las propiedades ópticas de tejidos biológicos, dada su alta precisión y robustez, aunque pueda haber ciertos problemas relativos a pérdidas de luz laterales o de diseño de las mismas (Prahl, 2010).

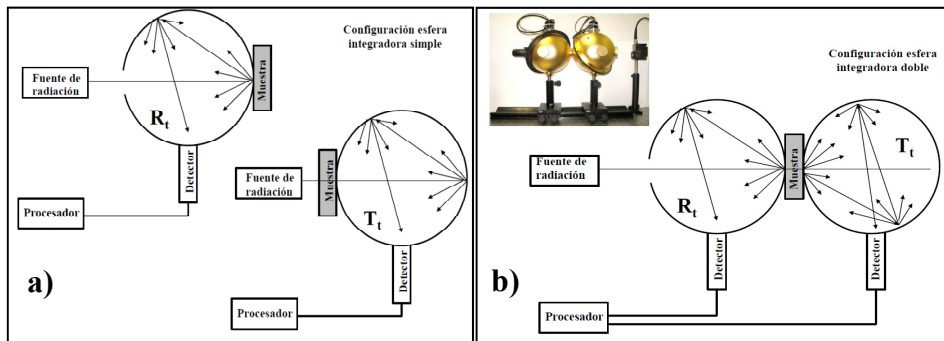


Figura 3.13. Esquema de medidas de reflectancia total (R_t) y transmitancia total (T_t) en esferas integradoras con configuración simple (a) o doble (b). Adaptado de Tuchin, 2007.

Tras medir experimentalmente la reflectancia total y la transmitancia total de una muestra, u alguna de las otras medidas experimentales anteriormente citadas, se debe emplear alguno de los indirectos iterativos mencionados para obtener los parámetros ópticos del material. A continuación, se exponen los algoritmos más empleados para solucionar el problema inverso de determinar las propiedades ópticas a partir de medidas experimentales de reflexión y transmitancia total:

El algoritmo *Adding-Doubling* (AD), o en castellano Método de Adición-Duplicación, calcula una solución numérica de la ecuación de transferencia radiativa mediante el cálculo iterativo para un volumen infinitesimal de la reflexión y transmisión total de la muestra. Ese volumen infinitesimal es duplicado hasta alcanzar un determinado espesor de la capa a estudio. Dado que el método AD calcula la reflectancia y transmitancia total a partir de los valores de propiedades ópticas (μ_a , μ_s , g y n), un proceso de cálculo inverso permite la extracción de esos valores a partir de datos experimentales de R_t y T_t . A este procedimiento o algoritmo inverso se denomina método Inverso de Adición-Duplicación (IAD, *Inverse Adding-Doubling*) (Prahl et al., 1993; Prahl 1995, 2010; Bashkatov et al., 2011). El algoritmo IAD más extendido estima las propiedades ópticas por iteración de forma que va cambiando los valores de R_t y T_t hasta que coinciden con los experimentales (Prahl, 2010). Como se ha incidido anteriormente, en caso de que además se cuenta con medidas adicionales como T_c o la función de fase, el algoritmo permite separar la contribución entre la dispersión y la distribución angular o anisotropía del coeficiente de dispersión reducido, por tanto, obteniéndose los valores de μ_s y g . En resumen, el algoritmo IAD consta de los siguientes pasos: 1) elección de unos parámetros ópticos al azar, 2) calcular la reflectancia y transmitancia total mediante el método, 3) compara los valores calculados con los medidos y 4) repetir el proceso hasta que ambos valores estén dentro de un nivel de precisión aceptable. Éste es uno de los métodos más ampliamente evaluados para medios con regímenes altamente difusos (tejidos biológicos), ya que no

depende del ratio entre las características de absorción y dispersión de la muestra. No obstante, existen limitaciones como que el método puede estar asociado a posibles pérdidas de radiación dispersa que puedan ocurrir por los laterales de la muestra, lo que puede producir una sobre-estimación de los coeficientes o que sus valores sean reducidos (Pickering et al., 1993). La precisión en la estima utilizando este método está entre 2-3 % en comparación con los valores reales (Prahl et al., 1993).

Existe un código IAD de dominio público, mejorado en los últimos años al considerar cuestiones relacionadas con las características reflexivas de las esferas integradoras y pérdidas laterales de luz durante las medidas, desarrollado por Scoth Prahl (Prahl, 2010)¹² para la determinación de las propiedades ópticas de muestras consideradas geoméricamente y ópticamente homogéneas. Éste es ampliamente utilizado en la literatura y ha sido validado por numerosos grupos de investigación para medidas procedentes tanto de esferas integradoras simples (Bashkatov et al., 2005; Gebhart et al., 2006) como dobles (Troy y Thennadil, 2001; Wei et al., 2005; Keranen y Makynen, 2008).

Otro algoritmo empleado para realizar estos estudios es el *Inverse Monte Carlo* (IMC), o Monte Carlo Inverso, el cual permite establecer los cálculos para geometrías más complejas y con mayor aproximación a la estructura real del tejido al ser un algoritmo más flexible que IAD (Bashkatov et al., 2011). Además, este algoritmo sí tiene en cuenta las pérdidas laterales de fotones, aspecto que para IAD era una limitación hasta la incorporación de cálculos basados en MC en su última versión (Prahl, 2010). El procedimiento de este método se basa en MC, anteriormente detallado, pero aplicado de una forma inversa, es decir, que a partir de las medidas experimentales de R_t y T_t se estiman las propiedades ópticas por cálculos iterativos que siguen la misma dinámica y estructura que la simulación de la propagación de la luz por MC (Yamada, 2000). Las limitaciones de esta metodología es su escasa eficiencia referida al largo tiempo computacional que necesita en comparación a IAD, ya que para obtener precisiones entorno al 2 % es necesario entre 2-5 iteraciones de paquetes de 100.000 fotones (Tuchin, 2007). Existen distintos códigos de dominio público; por hacer referencia a alguno de ellos destacar el desarrollado en el grupo del Prof. Xin-Hua Hu¹³.

La Figura 3.14 resume el proceso global para estimar las propiedades ópticas de un material. En primer lugar existe una etapa experimental para medir, normalmente mediante esferas integradoras, la reflectancia total (R_t) o transmitancia total (T_t), cuyos valores se emplean en algoritmos inversos iterativos como IAD o IMC para estimar las propiedades ópticas del material. Como se ha expuesto anteriormente, si se suponen previamente unos valores

¹² <http://omlc.ogi.edu/software/iad>

¹³ <http://bmlaser.physics.ecu.edu/>

de g y n , se obtienen μ_a y μ'_s . Si en vez de establecer un valor de g , se conoce la transmitancia colimada (T_c) o se ha determinado la función de fase de dispersión mediante un goniómetro (Figura 3.15) se puede estimar, además, g y μ_s (Bashkatov et al., 2011). Algunos autores indican que los coeficientes de absorción y dispersión no son muy sensibles a los valores de g , por lo que establecer un valor predeterminado en un rango aceptable para el tipo de material estudiado no causa mucha variación (Tuchin, 2007); no obstante, otros han indicado que es mejor usar una estrategia que permita estimar g de forma variable cuando su valor a-priori es desconocido (Saeys et al., 2008).

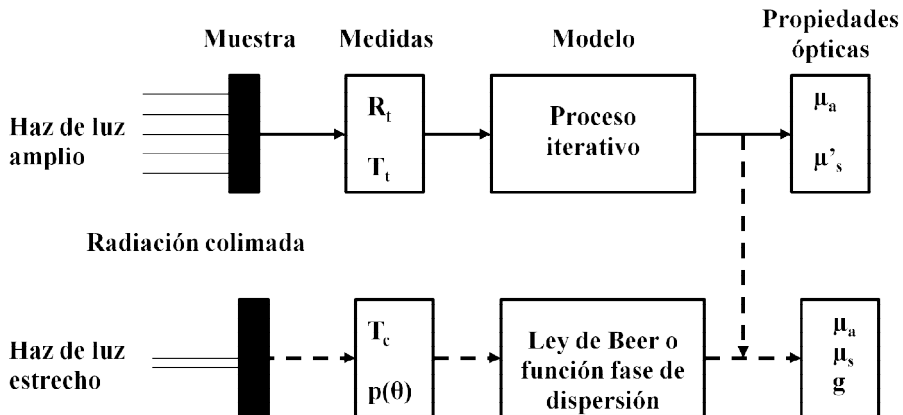


Figura 3.14. Esquema sintético de las etapas necesarias para estimar las propiedades ópticas de un material mediante estrategias IAD o IMC. Adaptado de Cheong et al., 1990.

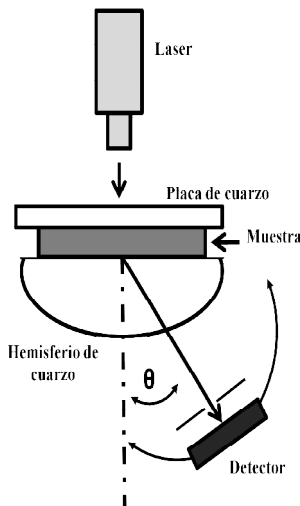


Figura 3.15. Diagrama de un goniómetro para determinar la función de fase de dispersión, $p(\theta)$. Adaptado de Tuchin, 2007.

En general, todas estas aproximaciones se basan en dar soluciones numéricas a la ecuación de transferencia radiativa (RTE, *Radiative Transport Equation*) que describe la propagación de la luz en medios dispersivos. No obstante, hay muchas fuentes de error, tales como aquellas relacionadas con la configuración de la esfera integradora (geometría de la radiación, resolución angular de los detectores, número de aperturas de las fibras ópticas, pérdidas de luz), condiciones fisiológicas de las muestras (*in vivo*, *in-vitro*, fresco/descongelado), coincidencia de los índices de refracción entre las superficies o que las medidas estén correlacionadas (como es el caso de T_c y T_t). Además, el algoritmo empleado también tiene su contribución en la

precisión de la estima (Bashkatov et al., 2011).

Existen también otras técnicas desarrolladas en los últimos años empleadas para la estimación de las propiedades ópticas de los tejidos biológicos. Este es el caso de Espectroscopía por Resolución Espacial (SRS, *Spatially Resolved Spectroscopy*), (r_{sd}), que se define como la energía dispersada de vuelta por unidad de área del detector que está situado en la superficie del material a analizar a una distancia (r_{sd}) de la fuente de radiación (Figura 3.16). Esta distancia se va variando para obtener distintas medidas. Esta técnica es muy útil para medidas *in vivo* donde la geometría del tejido sólo permite medir dispersión de vuelta (*backscattering*), además de que permite determinar con una sola medida ambas propiedades ópticas (Doornbos et al., 1999). La medida de esa reflectancia de dispersión de vuelta en función de la distancia entre detector y fuente de radiación permite, mediante la siguiente expresión matemática, que puedan estimarse los coeficientes de absorción y dispersión, en regímenes altamente difusos.

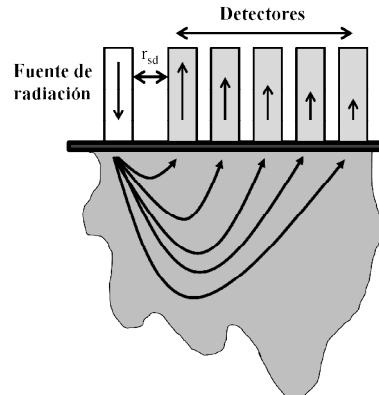


Figura 3.16. Esquema de medidas realizadas en Espectroscopía por Resolución Espacial.

Adaptado de Tuchin, 2007.

$$R = \frac{z_0 A}{2\pi} \left[\frac{\mu_{eff}}{r_{sd}^2} + \frac{1}{(r_{sd}^2 + z_0^2)^{3/2}} \right] \exp[-\mu_{eff}(r_{sd}^2 + z_0^2)^{1/2}]$$

donde $z_0 = K/\mu'_s$ es la longitud extrapolada, K es una constante adimensional con una magnitud que depende del parámetro anisotrópico de los *scatters* y del coeficiente de reflexión en la superficie, A es el área del detector y μ_{eff} (coeficiente de atenuación efectivo o inversa de la longitud de difusión) se define como $\mu_{eff} = [3\mu_a(\mu'_s + \mu_a)]^{1/2}$ (Farrell et al., 1992; Tuchin, 2007).

Una ecuación de difusión simplificada de la anterior, y que se usa comúnmente para medios infinitos homogéneos, es la denominada función de Green:

$$\Phi(r) = \frac{1}{4\pi D r} e^{(-\mu_{eff} r)}$$

donde D (coeficiente de difusión) es igual a $\frac{1}{3(\mu_a + \mu'_s)}$. La resolución de esta ecuación radica en el cálculo de μ_{eff} para un determinado colectivo de ratios de flujos $\Phi(r)$ y distancias r_{sd} (Svenmarker y Alxelsson, 2008).

Esta técnica considera la influencia específica de la función de fase de dispersión, por lo que no requiere de ninguna suposición previa en relación al factor anisotrópico g o el empleo de alguna función de fase teórica como HGPF, pudiéndose, por lo tanto, adaptar a modelos multicapas geométricos más complejos.

Una vez obtenidas las medidas experimentales, se utilizan algoritmos matemáticos iterativos como Monte Carlo para la obtención de los parámetros ópticos y resolver las ecuaciones anteriores. En este caso, la descripción de las variaciones en la propagación de la luz debido a las modificaciones entre la distancia de la fuente de luz y el detector necesitan de 3 parámetros (además del índice de refracción, n): μ_a , μ'_s y γ .

$$\gamma = \frac{1 - g_2}{1 - g_1}$$

donde g_1 se corresponde con el factor anisotrópico convencional (g) y g_2 con el segundo momento de la función fase. Por lo tanto, γ depende del índice de refracción relativo a las partículas y el ratio entre el tamaño de partícula y la longitud de onda. Puede variar entre 0,9 (Rayleighs) y valores mayores de 2 (tamaño de las partículas de dispersión mayores frente a las longitudes de onda). Estos parámetros traducidos a la función de fase de dispersión Henyey-Greenstein se corresponden con $g_2 = (g_1)^2$ y, por lo tanto, $g = g_1 = \gamma - 1$.

Medidas SRS se pueden realizar tanto con el uso de fibras ópticas móviles que permitan modificar la distancia entre la fibra óptica emisora de luz y la del detector en pequeños incrementos, como con equipos de imagen hiperespectral que se basan en el estudio de la luz reflejada en distintos píxeles de la imagen que tienen una distancia distinta con respecto a la fuente de luz (Qin y Lu, 2006, 2007). Una de las principales ventajas de esta técnica, para obtener medidas espectrales de las cuales poder obtener las propiedades ópticas de los tejidos, radica en que la configuración espectral puede realizarse con fuentes de radiación y detectores baratos, lo cual permite diseñar un equipo pequeño, simple de usar y económicamente más barato que IS o DIS. Un ejemplo que describe todo el proceso basado en medidas SRS para un producto agroalimentario como la leche puede encontrarse en Aernouts et al. (2011).

Las medidas de resolución temporal (TRS, *Time-Resolved Spectroscopy*) también permiten resolver la ecuación de transferencia radiativa para medios homogéneos y poder así estimar los parámetros ópticos (Cubeddu et al., 2001). Esta técnica se basa en la obtención de valores de reflectancia o transmitancia en función del tiempo, ya que se envían cortos pulsos (con frecuencia de picosegundos) de energía a lo largo del tiempo que se registran en detectores ultra-rápidos (Yamada, 1995; Yamada, 2000). En este caso, se plantea una ecuación analítica de la ecuación de migración de fotones que sugieren que el coeficiente de absorción puede ser medido como el gradiente de la curva de

caída de la reflectancia del medio en función del tiempo y el coeficiente de dispersión por el tiempo de máxima reflectancia (Yamada, 1995).

Diversos autores han realizado estudios en este ámbito, principalmente en tejidos humanos dada la importancia que tienen para aplicaciones biomédicas. No obstante, otros muchos tejidos han sido también estudiados. Cheong et al. (1990) hace una exhaustiva revisión de las propiedades ópticas de distintos tejidos biológicos en distintas especies y productos; ampliada posteriormente por Tuchin (2007) y actualizada por Bashkatov et al. (2011). A la hora de consultar estas revisiones hay que tener en cuenta que la variación en los resultados obtenidos por diferentes estudios podrían ser debidas a: 1) los supuestos de los modelos, 2) técnicas de medida, 3) equipo experimental, 4) calibración del instrumento y 5) heterogeneidad biológica de los tejidos.

Concretamente, en el caso de tejido porcino existen distintas publicaciones en la literatura. A continuación se realiza una sintética revisión de los estudios relacionados con estos aspectos para la epidermis, dermis y tejido adiposo de cerdo.

En cuanto a la epidermis, Cian et al. (2004) determinaron en el rango 1.000 – 1.600 nm las propiedades ópticas (μ_a y μ_s) de la epidermis y dermis de tejido cutáneo porcino. Los valores obtenidos por ellos variaron entre 0,55 – 1,0 cm^{-1} alrededor de 1.000 – 1.350 nm para el coeficiente de absorción de la epidermis y entre 3,0 - 11,2 cm^{-1} para las longitudes de onda 1.375 – 1.600 nm, obteniendo los mayores valores de μ_a entre 1.400 y 1.525 nm al ser una banda de absorción de agua. Los valores μ_s variaron entre 110 y 85 cm^{-1} de forma decreciente desde las longitudes de onda más cortas (1.000 nm) hasta las superiores (1.600 nm), siguiendo la explicación de la teoría de dispersión Rayleigh. Otros de los parámetros ópticos estudiado en epidermis porcina es el índice de refracción. Ding et al. (2005) observaron que variaron entre 1,417 y 1,37 de forma decreciente desde 1.000 a 1.600 nm.

Referente a la dermis, los valores μ_a variaron entre 0,5 y 10,6 cm^{-1} , obteniéndose los menores valores en longitudes de onda cortas y los valores mayores entorno a la banda 1.400 – 1.500 nm (Cian et al., 2004). En cuanto a los valores μ_s de la dermis, estos variaron de forma decreciente entre 112 y 85 cm^{-1} (Cian et al., 2004). Por su parte, Du et al. (2000) determinaron a partir de medidas realizadas en una esfera integradora simple y empleando el algoritmo IMC las propiedades ópticas de dermis de porcino en el rango 900-1.500 nm. Estos autores indican que los valores para μ_a varían entre 0,05 y 1,2 mm^{-1} , con dos picos de mayor absorción alrededor de 1.200 nm (grasa-agua) y 1.450 nm (agua). En cuanto a los valores de μ_s estos decrecen de forma casi lineal conforme mayor es la longitud de onda entre valores de 29 y 25 mm^{-1} . Además también calcularon los valores del factor de anisotropía (g) cuyos valores se mantuvieron constantes entorno a 0,9 para todo el rango, excepto en las longitudes de onda superiores a 1.400 nm (banda de absorción del agua) que

decreció a 0,85. Estos autores indicaron que el efecto de congelación de las muestras *in-vitro* en los valores del coeficiente de absorción en la dermis son insignificantes excepto en la banda de 1.450 nm que incrementó su valor en $0,2 \text{ mm}^{-1}$ debido a la hidratación de la muestra durante el almacenaje en congelación. Por su parte, los valores del coeficiente de dispersión y factor anisotrópico sí se vieron afectados, reduciendo sus valores a $24\text{-}21 \text{ mm}^{-1}$ (μ_s) y 0,88 (g), respectivamente. Los valores del índice de refracción (n) de esta capa fueron estudiados por Ding et al. (2005) que mostraron valores medios de 1,36.

En relación a la hipodermis, no hay estudios realizados hasta la fecha que describan las propiedades ópticas de este tejido en cerdo. No obstante, Bashkatov et al. (2005) estudiaron las propiedades ópticas de tejido adiposo en ratas con valores entre $1,5$ y $2,9 \text{ cm}^{-1}$ para μ_a y entre $107,5$ y 95 cm^{-1} para μ_s en el rango $1.000 - 1.600 \text{ nm}$. En cuanto a los valores del índice de refracción en tejido adiposo, diversos autores indican que se encuentra en torno a 1,455 (Tuchin, 2007; Bashkatov et al., 2011). Sin embargo, Cheng et al. (2002) desarrollaron un modelo basado en la ecuación de dispersión de Cauchy para estimar el índice de refracción de tejido adiposo porcino a partir de mediciones realizadas en cuatro longitudes de onda utilizando como fuente de luz un láser (488 nm , $632,8 \text{ nm}$, $1.079,5 \text{ nm}$ y $1.341,4 \text{ nm}$):

$$n(\lambda) = A + B\lambda^{-2} + C\lambda^{-4}$$

donde λ se refiere a la longitud de onda expresada en nanómetros y A, B y C son distintos Cauchy coeficientes con valores de 1,4753, 4,3902 y 0,92385 respectivamente.

Si bien no existen trabajos que describan las propiedades ópticas del tejido adiposo intacto porcino, Van Veen et al. (2004) estudiaron el coeficiente de absorción de la grasa fundida de este animal en el rango $600\text{-}1.100 \text{ nm}$. Dichos resultados, junto con una ampliación del rango estudiado ($500\text{-}2.500 \text{ nm}$), puede consultarse en la página web del grupo de investigación “Natural Phenomena Simulation” de la Universidad de Waterloo¹⁴. El espectro del coeficiente de absorción obtenido mostró bandas de absorción de grasa a 1.200 nm ($\mu_a = 1,4 \text{ cm}^{-1}$), 1.415 nm ($\mu_a = 1,1 \text{ cm}^{-1}$), $1.700\text{-}1.800 \text{ nm}$ ($\mu_a = 7\text{-}10 \text{ cm}^{-1}$), y $2.250\text{-}2.350 \text{ nm}$ ($\mu_{a \text{ max}} = 20\text{-}44 \text{ cm}^{-1}$).

Todos estos aspectos son esenciales para conocer la interacción entre la luz y la materia y, por tanto, de la información que se obtiene de la muestra según el modo de análisis, especialmente interesante para medidas *in vivo* o no destructivas de productos intactos. No obstante, hay que tener en cuenta que la mayoría de los estudios están restringidos a longitudes de onda cortas y zonas

¹⁴ <http://www.npsg.uwaterloo.ca/data/skin.php>

de muestreo con capas de espesores delgados (Norris, 2012). La banda de absorción relacionada con el agua, muy presente en los tejidos biológicos, en el rango 1.400 – 1.490 nm y en longitudes de onda superiores a 1.900 nm hacen que los valores de transmisión sean muy bajos y no se obtengan medidas con buena SNR (Norris, 2012). Normalmente, en medidas de reflectancia, aunque es posible muestrear muchas zonas, la penetración efectiva de la radiación reflejada es menor a 1 mm, donde la piel o epidermis domina la señal. La mayor ventana óptica de penetración de la radiación NIR se encuentra en el rango 700 - 900 nm (Abdo et al., 2007; Tuchin, 2007), ya que los tejidos biológicos están compuestos mayoritariamente de agua, hemoglobina y cromóforos como melatonina que enmascaran a otros compuestos interesantes.

No obstante, hay que tener en cuenta que muchas medidas espectroscópicas se realizan en modo de interactancia con fibras ópticas en contacto directo con la superficie de la muestra. La distancia entre detector-fuente de luz en este tipo de configuraciones influye en la penetración efectiva de la radiación incidente, tal y como ha quedado reflejado en el principio teórico de la técnica SRS. Normalmente, a mayor distancia entre el detector y la fuente de luz, mayor será la profundidad efectiva. Sin embargo, esta relación es inversamente proporcional a la radiación detectada (Iino et al., 2002; Arimoto et al., 2005; Norris, 2012). Además, es importante tener en cuenta que la penetración de la luz es dependiente de la longitud de onda estudiada (Lammertyn et al., 2000).

3.3.4. Análisis multivariante de datos NIRS

La tecnología NIRS, como otros sensores, desde un punto de vista matemático proporciona un colectivo de datos que contiene información tanto física como química. Sin embargo, como se ha mencionado anteriormente, un espectro NIRS es una matriz de datos compleja que resulta de la combinación de diversos compuestos y/o propiedades de la muestra analizada. Por consiguiente, es fundamental correlacionar la información espectral medida con los parámetros de interés analizados por el/los métodos de referencia o con las categorías y/o clases pertinentes mediante diferentes procedimientos matemáticos. La aplicación de estos métodos de análisis de datos estadísticos y matemáticos, normalmente multivariantes, para obtener información físico-química de datos analíticos se han denominado tradicionalmente quimiometría (Martens y Martens, 2001).

La Figura 3.17 muestra un esquema que sintetiza las etapas básicas para desarrollar modelos de calibración NIRS. La selección de muestras es una fase crítica dada la importancia de incluir en los modelos toda la variabilidad del producto/proceso para que después puedan ser utilizados en análisis de rutina. Las muestras seleccionadas deben ser analizadas tanto espectralmente como por vía química para los distintos parámetros de interés (variables dependientes en la calibración). El desarrollo de modelos de calibración NIRS

es una tarea compleja que consume bastante tiempo dado que requiere de la evaluación de distintos pretratamientos de la señal, para eliminar fuentes de variabilidad no relevantes, información redundante y no linealidades, algoritmos multivariantes para desarrollar los modelos (ya sean cuantitativos o cualitativos) y la utilización de metodologías para la detección de muestras anómalas tanto espectrales como químicas. Una vez desarrollado los modelos, es recomendable validar externamente la exactitud, precisión y robustez de los mismos, aunque es posible obtener valores aproximados mediante validación cruzada antes de implementarlos en el análisis de rutina. No obstante, aunque los modelos puedan ser usados en rutina es esencial la supervisión de los mismos y evaluar su correcto funcionamiento a lo largo del tiempo, además de incluir nuevas fuentes de variabilidad que pudieran aparecer y no hubieran sido incluidas en el modelo inicialmente.

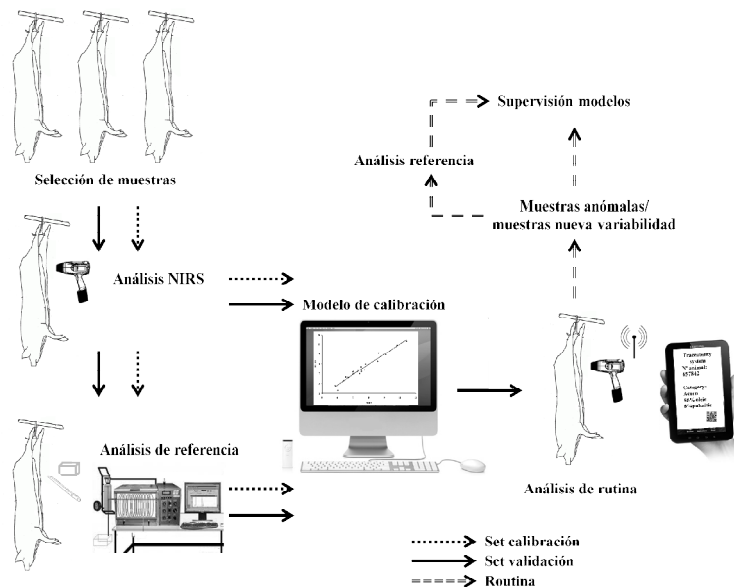


Figura 3.17. Diagrama con las etapas básicas para desarrollar un modelo de calibración NIRS e implementarlo en análisis de rutina.

Fuente: Elaboración propia

Desde los inicios de la tecnología NIRS, los investigadores y técnicos de este campo han mostrado su preocupación por el desarrollo de protocolos y/o estándares para el análisis de datos espectrales NIRS, así como para el diseño y evaluación de sistemas de control basados en este tipo de sensores. Desde la primera guía redactada por investigadores del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA, *United State Department of Agriculture*) que asentaba las bases de la tecnología NIRS y los procedimientos relacionados con el desarrollo y evaluación de calibraciones (Martens et al., 1989), se han publicado varias guías normalizadas, sobre todo en el ámbito de la industria farmacéutica, que establecen los procedimientos de diseño, análisis y control

de los procesos de fabricación industriales (PAT, *Process Analytical Technology*) en base a sensores espectrales como sistema de control. Destaca el documento redactado por Broad et al. (2002), la recientemente revisada ASTM E1655-05 (2012) por la Sociedad Americana de Ensayos y Materiales o la publicada por la Agencia Europea del Medicamento (EMA, 2012). En el ámbito agroalimentario, se ha publicado una norma ISO que proporciona una guía para el uso de la espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano para el control de cereales y piensos animales (ISO 12099:2010) en base a la experiencia acumulada durante todos estos años por diversos investigadores internacionales. Todas ellas establecen las mismas pautas en cuanto al desarrollo y validación de aplicaciones basadas en la tecnología NIRS, siendo sus contenidos bastantes generalizables a otros tipos de productos. De hecho, estas guías lo que establecen son una serie de pautas normalizadas y vocabulario específico (glosarios muy completos se pueden encontrar en ISO 12099:2010 y EMA, 2012) para poder desarrollar modelos adecuados NIRS que puedan usarse en rutina para el control de calidad de un determinado producto, indicando los aspectos claves a tener en cuenta y los procedimientos correctos que se deben llevar a cabo en cuanto a instrumentación (selección y diagnóstico de estabilidad), colectivo de muestras (muestreo, análisis de referencia y espectral), desarrollo de modelos predictivos cualitativos y/o cuantitativos (calibración, tratamiento de la señal espectral, detección de anómalos, validación), estadísticos y procedimientos de estandarización de equipos NIRS.

No obstante, en este apartado se resumen las principales herramientas matemática/estadísticas/quimiométricas necesarias para manejar bases de datos NIRS y los principales algoritmos usados, especialmente aquellos evaluados en el marco de esta tesis doctoral. Una revisión más detallada de los métodos matemáticos desarrollados para el análisis/interpretación de datos NIRS nos alejaría de los objetivos de esta tesis doctoral.

3.3.4.1. Selección de muestras y repetibilidad espectral

Los modelos de calibración de mezclas homogéneas pueden requerir menos muestras de calibración que, por ejemplo, muestras agroalimentarias dada su heterogeneidad y mayor complejidad en la composición. En ambos casos, es importante que la distribución de los datos de referencia sea uniforme en todo el rango en vez de que muestren una tendencia normal o gaussiana, ya que las muestras centrales podrían tener mayor influencia en el modelo que las otras (Esteve y Hurburg, 2009). Hay procedimientos matemáticos que permiten la selección de muestras basadas en información espectral para cubrir toda la posible variabilidad presente en el proceso/producto, reduciendo así el número de muestras que necesitarían ser enviadas a un laboratorio de referencia, lo que puede suponer un mayor coste económico (Shenk y Westerhaus, 1991a). No obstante, la distribución de muestras debe ser evaluada en función del objetivo propuesto (EMA, 2012).

No hay una regla concreta que determine el número de muestras que se deben incluir en la calibración, éste dependerá de la complejidad de la matriz del producto a analizar o de otras posibles interferencias. No obstante, para evitar posibles sesgos o errores sistemáticos, se recomienda que el número de muestras supere al número de factores utilizados en el modelo de regresión (EMEA, 2012). Por ejemplo, ASTM E16655-05 recomienda, para estudios de viabilidad de una aplicación concreta, entre 30 ó 50 muestras para cubrir todo el rango de variabilidad de un producto o proceso.

Tan importante como la selección de muestras representativas o la calidad de los datos de referencia es la calidad de la información espectral recogida. Comprobar semanalmente los diagnósticos del instrumento referentes al ruido fotométrico y reproducibilidad, precisión y exactitud de las longitudes de onda nos puede ayudar a detectar posibles fallos instrumentales (ISO 12099:2010). Además, una inspección visual puede ayudar a identificar espectros anormales o con alto ruido; aunque esto puede no ser suficiente. La repetibilidad espectral puede ser usada para este objetivo ya que este concepto radica en que la variabilidad entre espectros de una misma muestra no sea mayor que la variabilidad entre muestras distintas. El estadístico Raíz Cuadrática Media (RMS, *Root Mean Square*), calculado como el valor medio de la raíz cuadrática de las diferencias entre espectros de una misma muestra o submuestras analizadas en el mismo instrumento para un número determinado de longitudes de onda (Shenk y Westerhaus, 1995, 1996), puede ayudar a identificar espectros que muestren variaciones considerables. El estadístico RMS para una muestra individual (j) se define como:

$$RMS_j = 10^6 \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n D_{ij}^2}{n}}; \quad D_{ij} = y_{ij} - \tilde{y}_i$$

donde y_{ij} es $\log(1/R)$ a la longitud de onda i para la submuestra h y \tilde{y}_i es $\log(1/R)$ a la longitud de onda i para el espectro medio de N submuestras de una muestra; n es el número de puntos de datos tomados en el instrumento.

Con el objetivo de establecer un límite admisible para evaluar la similitud espectral y poder considerar un espectro de buena calidad para un determinado instrumento y modo de presentación de la muestra se define un valor límite de RMS de la desviación estándar (Martínez et al., 1998):

$$STD_{\text{limite}} = 1,036 \times \sqrt{\sum_{k=1}^{k=m} STD_k^2 / m}$$

donde STD es la desviación estándar para cada muestra y m es el número de muestras. El valor de STD para una muestra viene definido por la fórmula:

$$STD = \sqrt{\sum_{j=1}^N (RMS_j)^2 / (N - 1)}$$

siendo N el número de submuestras.

En el caso de muestras de grasa fundida analizadas en equipos NIRS de altas prestaciones científico-técnicas, como Foss NIRSystems 6500 trabajando en modo transfectancia, se recomienda un valor límite de 4.000 $\mu\log(1/R)$ para controlar la repetibilidad espectral (García-Olmo, 2002); mientras para muestras de carne picada homogenizada analizadas en reflectancia se recomienda un valor máximo de 19.992 $\mu\log(1/R)$ (Martínez et al., 1998).

Este estadístico es, asimismo, utilizado para evaluar la similitud espectral entre muestras diferentes de un mismo producto, la misma muestra analizada en instrumentos distintos o para controlar el nivel de ruido de un instrumento si se evalúa un material de referencia.

3.3.4.2. Pre-tratamiento espectral

La elección de las técnicas de preprocesado del espectro más adecuadas para un determinado modelo es un punto crítico en el análisis y modelización de datos espectrales, ya que permite eliminar información redundante y no relevante, no linealidades y reducir el nivel de ruido de los datos, lo que implica la posibilidad de crear modelos más robustos y parsimoniosos aunque intrínsecamente no conlleve una mejora de sus capacidades predictivas. Existen pretratamientos de diferentes tipos: corrección de la línea base - normalización, mejora de la señal y filtrado estadístico de la señal/ruido. A continuación se presenta una descripción sintética de los principales tratamientos de preprocesado más frecuentes en el tratamiento de datos espectrales NIRS:

- Centrado: pre-tratamiento básico que elimina la preponderancia en el modelo de una variable que presente una gran variedad numérica frente a otra variable (Haaland y Thomas, 1988). Matemáticamente consiste en calcular el valor medio de cada columna (m) (variable, en el caso de datos NIRS cada longitud de onda) y restarle este número a cada valor de la columna (x):

$$x_{\text{centrado}} = x - m$$

- Escalado: consiste en dividir los datos de cada longitud de onda por su desviación estándar (s), lo que permite a cada longitud de onda tener el mismo peso en la calibración.

$$x_{\text{escalado}} = \frac{x}{s}$$

Con datos espectroscópicos no es necesario emplear el escalado de las variables ya que todos ellos se tienen misma escala. Por

tanto, sus magnitudes no están distorsionadas y son proporcionales a la información que contienen.

- Corrección del Efecto Multiplicativo de la Dispersión (MSC, *Multiplicative Scatter Correction*): reduce los efectos de la radiación dispersa e incrementan la relación entre la señal espectral y el parámetro de interés. Consiste en calcular el espectro medio de todas las muestras y realizar una regresión lineal univariante entre ese espectro y cada uno de los espectros del colectivo. Con ese proceso se calcula la pendiente y ordenada de la recta de regresión que serán restados y divididos a cada espectro individualmente para corregirlo (Geladi et al., 1985).

$$x = a + b x_{\text{medio}} + e$$

$$x_{\text{corregido}} = \frac{x - a}{b}$$

donde x es cada espectro del colectivo, y x_{medio} el espectro medio del colectivo. Hay que tener en cuenta que este tratamiento utiliza todas las muestras, por lo que si se detecta y elimina alguna muestra anómala, hay que recalcular MSC con el nuevo colectivo.

- Variable Normal Estándar (SNV, *Standard Normal Variate*): se utiliza para corregir efectos producidos por la radiación dispersa, que se produce por la presencia de partículas con distintos tamaños en la muestra (Barnes et al., 1989).

En comparación, SNV centra y escala cada espectro de forma individual e independiente; mientras MSC calcula el espectro medio de todas las muestras y realiza una regresión lineal univariante entre ese espectro y cada uno de los que pertenece al colectivo. Ambos pretratamientos proporcionan resultados similares para la mayoría de aplicaciones (Dhanoa et al., 1994), aunque trabajen con geometría espacial diferente (Fearn et al., 2009).

- *Detrending* (DT): algoritmo que se emplea, normalmente, con el tratamiento SNV ya que éste no corrige curvaturas en la línea base.
- Derivadas: son empleadas para corregir problemas de línea base o de solapamiento de bandas. El algoritmo más empleado es Savitzky-Golay que realiza simultáneamente un suavizado espectral y calcula la derivada de los datos para equilibrar la importancia de todas las longitudes de onda (Savitzky y Golay, 1964). En la literatura es muy frecuente el empleo de la primera y segunda derivada. La primera derivada consiste en restar a cada variable (longitud de onda) su vecina inmediata, por lo que elimina todo excepto las partes de la señal que son diferentes, corrigiendo así

desviaciones de la línea base; mientras que la segunda derivada consiste en repetir el mismo proceso una vez más, enfatizando el efecto suavizado sobre la señal (Wise et al., 2006). En espectroscopía NIR, se ha usado con frecuencia la segunda derivada que permite diferenciar picos solapados y reducir la curvatura de la línea base. La primera derivada también tiene estos efectos, pero en menor grado.

Un aspecto práctico sobre el algoritmo Savitzky-Golay a considerar son los parámetros a controlar. Existen tres parámetros que pueden ser modificados para suavizar en mayor o menor medida el espectro: tamaño de ventana, orden del polinomio y orden de la derivada (Wise et al., 2006). Conforme mayor es el orden de la derivada más intenso es el efecto suavizador, y de la misma forma conforme el tamaño de ventana es mayor y el orden del polinomio menor más intenso es el efecto suavizador. Otro algoritmo, desarrollado por Norris y Williams (1984), permite la obtención de derivadas espectrales con menos influencia del ruido calculando la diferencia de valores medios de absorbancia del “segmento” de longitudes de onda seleccionadas. Además, definen otro parámetro denominado “espaciado” como el intervalo de longitudes de onda que separa los dos segmentos a mediar. Recientemente, Norris y Davies (2011 y 2012) propusieron el cálculo de la cuarta derivada de los espectros con este algoritmo para aspectos de detección de ruido instrumental, identificación de bandas atmosféricas e interpretación de bandas de absorción relacionadas con la composición química de las muestras, cuestión bastante compleja y difícil en la región del infrarrojo cercano. La localización de bandas asociadas a determinados compuestos (por ejemplo, ácidos grasos) puede resultar interesante tanto del punto de vista de desarrollo y optimización de modelos predictivos como del diseño de instrumentos NIRS de menores costes.

- Corrección ortogonal de la señal (OSC, *Orthogonal Signal Correction*): método de pretratamiento de la señal espectral más sofisticado que elimina la variabilidad en la señal espectral que es ortogonal (perpendicular) a la información de interés. Esta técnica suele emplearse, principalmente, en estrategias de estandarización/clonación (Wold et al., 1998).

No hay una combinación óptima de pretratamientos para una determinada base de datos espectrales; aunque sí se recomienda aplicar primero aquellos procedimientos que afecten a las muestras (filas de la matriz de datos) como MSC o derivadas ya que eliminan la varianza no deseada de cada muestra sin afectar a las otras y, posteriormente, aplicarse aquellos tratamientos que afecten a las variables (columnas de la matriz de datos) como centrado o escalado, ya que estos métodos asumen que cualquier varianza en los datos es

interesante y útil en el modelo (Wise et al., 2006). A las medidas de reflectancia frecuentemente se les aplica MSC o SNV+DT dado que reducen el efecto de la luz dispersa. Siempre se debe evaluar un nivel de compromiso entre el aumento de la calidad de la señal instrumental producida por los pretratamientos y la pérdida de información relevante asociada (Esteve y Hurburg, 2009), aunque Fernández-Cabanás et al. (2007) indicó que diferentes combinaciones de pretratamientos de la señal espectral puede influir más bien en la capacidad para detectar muestras anómalas y ello provoca las diferencias en la capacidad predictiva de los distintos modelos.

3.3.4.3. *Análisis exploratorio de bases de datos espectrales*

El Análisis de Componentes Principales (PCA, *Principal Component Analysis*) es un algoritmo que permite simplificar la matriz de datos, agilizando, por tanto, otros cálculos complejos como medidas de distancias espectrales, lo cual es especialmente útil para la detección de muestras espectralmente anómalas. Otros usos relevantes son los relacionados con la obtención de información sobre las variables (longitudes de onda) más importantes e indicaciones sobre el tipo de modelado más apropiado para ese colectivo de muestras. Geométricamente un PCA proyecta la matriz de datos en un nuevo subespacio simplificado con unas nuevas dimensiones denominadas Componentes Principales (PCs, *Principal Components*) (Wold, 1987; Bertrand, 2000). Estas nuevas variables, que son ortogonales entre sí, se calculan en base a la alta correlación inicial de las mismas. Por tanto, cada PC contiene información distinta y describen las fuentes de variabilidad más importantes del conjunto de muestras; de modo que la primera PC describe mayor porcentaje de variabilidad que la siguiente y así sucesivamente. Esto hace que una PCA pueda ser considerada como un pretratamiento de los datos espectrales para obtener información relevante del colectivo (Bertrand, 2000).

En relación al número óptimo de componentes principales a seleccionar no existe un único criterio a aplicar. En muchos casos depende de la experiencia que tiene el profesional tanto del producto, del proceso productivo, del algoritmo quimiométrico aplicado y otros muchos factores. Sin embargo, existen muchas reglas que pueden seguirse y son igualmente aplicables a otros algoritmos que se basen en reducción de variables (p.e. PCA o PLS):

- Cada 4 ó 5 muestras del colectivo de calibración, seleccionar una componente principal.
- Analizar el error típico de validación cruzada (SECV, *Standard Error of Cross Validation*) en función del número de componentes y elegir aquel que reduzca el valor de ese error al mínimo. No obstante, la mejor opción no es normalmente la seguida por este criterio.
- Analizar la evaluación del error típico de calibración (SEC, *Standard Error of Calibration*) y el de validación cruzada (SECV),

eligiendo el número de componentes principales de forma que la diferencia entre ambos valores sea baja. Se considera que si SEC es menor que SECV en torno a un 20 % es indicativo de sobreajuste del modelo.

- Basar la elección en que las magnitudes de los parámetros SEC y SECV sea baja.
- Analizar en qué proporción mejora el error predictivo (SEP, *Standard Error of Prediction*) conforme se añade una componente principal más al modelo, es decir, comparar la varianza explicada que se añade al modelo en función de la mejora en las capacidades predictivas.

No obstante, siempre es recomendable un estudio individualizado del modelo desarrollado para el producto en concreto y tender a la creación de un modelo robusto en vez de seleccionar un número elevado de PC's y mejorar el error predictivo en decremento de la robustez del modelo.

La detección de muestras espectralmente anómalas es un punto crítico en el desarrollo de modelos NIRS de calibración, ya que pueden influir en la capacidad predictiva de los modelos y la viabilidad/potencial de la tecnología para una aplicación concreta. Existen distintos procedimientos basados en el análisis de los valores de residuales (Q) y Hotellings (T^2) obtenidos en un análisis PCA o en el cálculo de distancias entre muestras o al centro del colectivo de muestras en un espacio multi-variable como el definido por PCA o con otros algoritmos como el de Mínimos Cuadrado Parciales (PLS, *Partial Least Square*). La distancia de Mahalanobis, o su versión escalada denominada H en algunos software, es utilizada para determinar la distancia de un punto a un grupo de otros puntos. Está ampliamente extendido en la comunidad NIRS vinculada al sector agroalimentario el uso de la distancia de Mahalanobis para detectar muestras anómalas. Valores de la Distancia Global de Mahalanobis (GH, *Global Mahalanobis Distance*), definida como la distancia entre una muestra y el centro de la población en el espacio definido por un análisis de componentes principales, superiores a 3 indican muestras espectralmente anómalas, al igual que muestras con valores de NH (Distancia de Mahalanobis de Vecinos o *Neighborhood Distance*, definida como la distancia entre una muestra y aquella más cercana a ella en una PCA) superiores a 1-1,2, ya que son consideradas como muestras lejanas al colectivo de calibración (Shenk y Westerhaus, 1991a, 1991b). No obstante, el uso de la distancia de Mahalanobis es correcto cuando se usan colectivos distribuidos en base a una normal, pero no en el caso de colectivos de datos con distribución no normal, ya que la distancia calculada puede no reflejar la posición real de los puntos (Fearn, 2011).

Sin embargo, hay que tener en cuenta que en el desarrollo de modelos predictivos NIRS también es importante detectar aquellas muestras que son anómalas químicamente (ISO 12099:2010). Este tipo de muestras anómalas

que se detectan durante el proceso de calibración y pueden ser de dos tipos: muestras con una composición relativamente extrema respecto del conjunto del colectivo de calibración como muestras cuyo valor predicho difiere significativamente, en términos estadísticos, del valor de referencia. Esto puede deberse a errores en los valores del análisis de referencia, transcripciones de los datos o fallo del modelo (ASTM E1655-05, 2012). Un procedimiento bastante extendido en el desarrollo de modelos NIRS cuantitativos, y aplicado en los modelos desarrollados en esta tesis doctoral, se basa en el cálculo del estadístico t de Student, calculado como la diferencia entre el valor de referencia y predicho. Un valor crítico de $t > 2,5$ indicaría una diferencia entre ambos valores bastante amplia pudiéndose considerar esa muestra como anómalo químico (Howard y Workman, 2003).

3.3.4.4. Modelos cuantitativos

Los modelos NIRS cuantitativos buscan correlacionar la información espectral con la concentración o porcentaje de uno o varios componentes de una muestra o con algún parámetro físico de un producto. Estos algoritmos se pueden clasificar en lineales o no lineales (Figura 3.18). Una revisión exhaustiva y normalizada de los algoritmos más utilizados para el desarrollo de modelos cuantitativos basados en

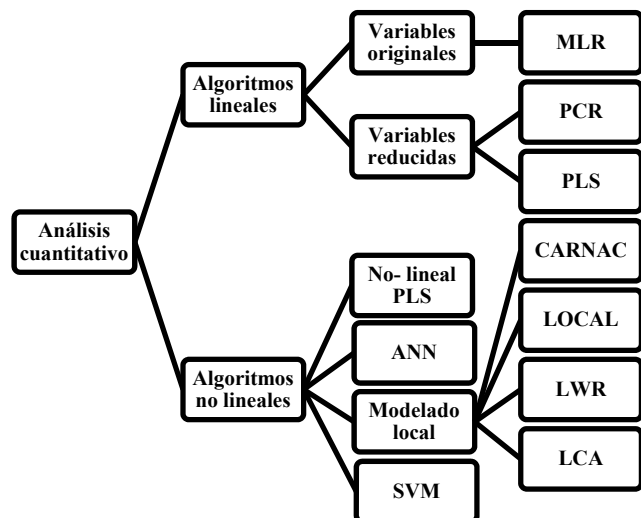


Figura 3.18. Algoritmos multivariantes más frecuentes para aplicaciones cuantitativas.

Fuente: Elaboración propia

datos espectrales en el rango del infrarrojo cercano se puede encontrar en ISO 12099:2010 y en ASTM E1655-05 (2012). En esta sección se recoge una breve descripción de las principales características de los algoritmos más frecuentes en el análisis multivariante cuantitativo de datos espectroscópicos NIRS, ya que un análisis más exhaustivo quedaría fuera de los objetivos de esta revisión bibliográfica.

a. Algoritmos lineales

Los algoritmos lineales establecen una relación lineal entre la señal espectral y cada parámetro de interés que se quiere determinar de la muestra. Esto se basa en asumir que la relación entre la absorbancia y la concentración del

analito cumple la ley de Beer-Lambert. Por ello, métodos de ajuste lineal como Regresión Lineal Múltiple (MLR), Regresión en Componentes Principales (PCR) y Regresión de Mínimos Cuadrados Parciales (PLS) son aplicados con este tipo de datos.

a.1. Regresión Lineal Múltiple (MLR, *Multiple Linear Regression*)

Este algoritmo calcula el modelo regresión en base a todas las variables espectrales disponibles y los valores analíticos (Strenberg et al., 1960), por lo que no realiza una simplificación de las variables. Una de las limitaciones de este algoritmo es la alta colinearidad entre las longitudes de onda NIR, lo que hace que las calibraciones puedan ser inestables y den varias soluciones. Por eso, este método sólo se considera apropiado si ha habido una selección previa de longitudes de onda no correlacionadas (Esteve y Hurburg, 2009).

a.2. Regresión de Componentes Principales (PCR, *Principal Component Regression*)

PCR se basa en la descomposición de la matriz de datos espectrales mediante una PCA, por lo que genera unas nuevas variables ortogonales no correlacionadas (PCs), con las cuales desarrolla una regresión lineal junto con la matriz de datos que contiene la información de referencia. El inconveniente de este algoritmo es que PCR sólo usa la información espectral para calcular las nuevas variables, por lo que éstas son las que mejor representan la matriz de datos X, lo que no quiere decir que sean las más apropiadas para estimar los parámetros de la matriz Y (Massart et al., 1997).

a.3. Regresión de Mínimos Cuadrados Parciales (PLS, *Partial Least Square Regression*)

El algoritmo PLS se diferencia del PCR en que las nuevas variables ortogonales no sólo se calculan a partir de la matriz de datos espectrales (por lo que sólo se seleccionarían en base al porcentaje de varianza explicada en X), sino que también consideran la matriz de los valores de referencia. De este modo, las nuevas variables (LV, *Latent Variables*) maximizan la varianza explicada de la matriz espectral (X) de forma que sea relevante para predecir los parámetros de la matriz con los datos de referencia (Y) (Martens y Naes, 1985; Wold et al., 2001; Faber y Bro, 2002).

Existen dos algoritmos PLS: PLS1 y PLS2 (Manne, 1987). PLS2 tiene en cuenta para el cálculo de las LV varios parámetros de referencia a la vez, mientras PLS1 se basa en el desarrollo de un modelo PLS para cada uno de los parámetros independientemente. En algunos software quimiométricos, como WinISITM, existen algunas modificaciones de este algoritmo (M-PLS, *Modified Partial Least Square Regression*). En la regresión M-PLS, los valores residuales obtenidos del cálculo de cada término de regresión se estandarizan dividiéndolos por las desviaciones estándares de los residuos para cada longitud de onda antes de calcular el factor siguiente. Este método es a

menudo más estable y preciso que el algoritmo PLS (Shenk y Westerhaus, 1995).

En estos algoritmos (PCR y PLS), al igual que en PCA, un parámetro crítico a optimizar es el número de factores del modelo de calibración, ya que un número reducido puede causar que la estima sea inestable y que pequeños cambios en el espectro, como los debidos al ruido espectral, puedan producir cambios estadísticamente significativos, o por el contrario, si el número de factores es excesivo se producirá un sobreajuste del modelo. De modo que aunque el porcentaje de variabilidad explicada por el modelo fuera superior y los errores menores, su robustez disminuiría. ASTM E1655-05 (2012) da algunas recomendaciones en cuanto a este hecho. No obstante, los mismos criterios expuestos para PCA y la utilización del procedimiento de validación cruzada son frecuentemente empleados para elegir ese número de factores. En general, si la Raíz Cuadrática Media del Error Típico de Calibración (RMSEC, *Root Mean Square Error of Calibration*) es mayor en un 20 % a la Raíz Cuadrática Media del Error Típico de Validación Cruzada (RMSECV, *Root Mean Square Error of Cross-Validation*) se puede considerar que hay un sobreajuste en el modelo.

b. Algoritmos no lineales

En muchos casos la relación que se pretende modelar no es lineal debido a desviaciones en la ley de Beer-Lambert causadas por efectos multiplicativos de la señal instrumental, efectos de naturaleza intrínseca al parámetro que se persigue medir (Bertran et al., 1999; Pérez-Marín et al., 2007b) y/o a que el colectivo de muestras sea muy amplio y variable. Muchas de esas no linealidades pueden desaparecer con ciertas transformaciones de los datos, como un adecuado pre-tratamiento de la señal instrumental o incluso los mismos algoritmos multivariantes pueden modelar ciertos aspectos. Sin embargo, cuando esas tendencias son muy marcadas es necesario utilizar algoritmos enfocados a afrontar directamente estas características.

Si bien una de las etapas del algoritmo PLS se basa en una regresión lineal entre los datos espectrales y de referencia, una variación de este algoritmo consistente en cambiar esa relación interna lineal por una función polinomial hace que el algoritmo pueda modelar situaciones no lineales más complejas (Wise et al., 2006). Pérez-Marín et al. (2007b) publicaron una revisión de algoritmos no lineales aplicados al análisis cuantitativo NIRS. Ellos hacen una descripción teórica y práctica de algoritmos no lineales como Redes Neuronales Artificiales (ANN, *Artificial Neural Network*) y otras aproximaciones locales como Análisis Comparado usando Datos Reestructurados de Infrarrojo Cercano (CARNAC, *Comparison Analysis using Restructured Near Infrared Constituent Data*), Regresión Localmente Ponderada (LWR, *Locally Weighted Regression*) y el algoritmo, patentado por Shenk y Westerhaus, LOCAL. Además de estos algoritmos, en la literatura

han aparecido otros que también son de interés como el Algoritmo Central Local (LCA, *Local Central Algorithm*) o las Máquinas de Vectores Soporte (SVM, *Support Vector Machine*). A continuación se hace una breve descripción de algunas de estas estrategias:

b.1. Modificación de la relación interna PLS.

El algoritmo PLS intenta maximizar la covarianza entre los valores de coordenadas (*scores*) calculados a partir de la matriz de datos espectrales y la de los parámetros de interés mediante un algoritmo basado en una regresión lineal.

Existen variaciones de este algoritmo que consisten en cambiar esa relación interna basada en una regresión lineal, a una no-lineal, como puede ser la utilización de una función polinomial (Wise et al., 2006). En función del grado del polinomio que se seleccione, el algoritmo PLS intentará ajustar el modelo a una tendencia curvilínea cuando el grado sea dos o a una más compleja si este parámetro es superior.

Esta es la única diferencia frente al algoritmo PLS y, por lo tanto, el resto de consideraciones realizadas para la variante lineal deben ser consideradas también en este caso.

b.2. Redes neuronales.

Las redes neuronales intentan construir sistemas de procesamiento de la información paralelos, distribuidos y adaptativos, que puedan presentar un cierto comportamiento inteligente (Martín y Sanz, 2001). Existen distintos tipos de redes neuronales, aunque todas ellas están compuestas de pequeñas e interconectadas unidades (neuronas) cuyo comportamiento individual viene determinado por el comportamiento general de la red que conforman todas. Los parámetros fundamentales de la red son: número de capas, número de neuronas en cada capa y el tipo de conexiones entre neuronas (Pérez-Marín et al., 2007b). La red neuronal más común es la denominada percepción multicapa, si bien también existen modelos basados en redes de tipo Kohonen o las de la función radial base. Hay que tener en cuenta que aunque la flexibilidad de las ANN es alta, es recomendable utilizar tratamientos de corrección de la señal así como algoritmos de compresión de datos que eliminen información irrelevante como PCA o PLS para el tratamiento de las variables de entrada en la red (Borggaard, 2001). Pérez-Marín et al. (2007b) describe exhaustivamente en su revisión este tipo de algoritmos no lineales.

b.3. Regresiones locales.

Básicamente consisten en calcular un modelo específico para cada muestra a predecir a partir de un colectivo de muestras similares a la desconocida que han sido seleccionadas dentro de un conjunto de muestras más amplio (Shenk et al, 1997; Naes et al, 2002). Este tipo de modelos permite contar con las ventajas de calibraciones globales, al tener un amplio colectivo de muestras

para cubrir una amplia fuente de variabilidad del producto junto con la exactitud de modelos específicos para cada muestra individual (Pérez-Marín et al., 2007b).

En general, los distintos métodos de regresión local se basan en identificar y seleccionar un colectivo de muestras locales semejantes a la muestra desconocida a predecir y, a partir de ellos, realizar una regresión posterior individual para cada muestra (Figura 3.19). En la bibliografía existen distintas aproximaciones locales que utilizan criterios de selección de muestras locales distintos o una forma diferente de calcular la regresión.

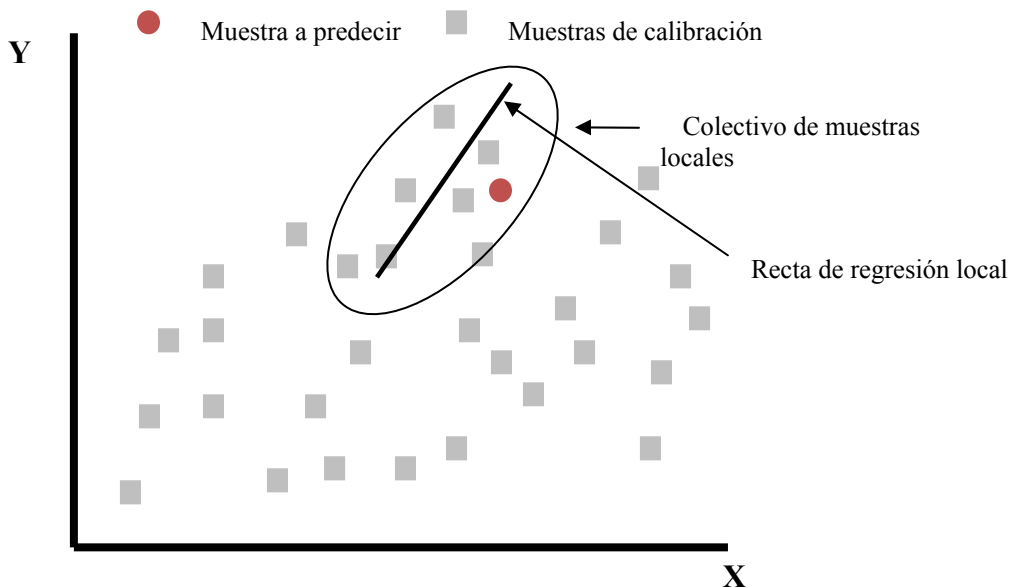


Figura 3.19. Esquema de funcionamiento de un algoritmo de regresión local. Fuente: Elaboración propia.

Dentro de esta categoría se encuentran los siguientes algoritmos:

- Método CARNAC

Propuesto por Davies et al. (1988) se centra en la selección de muestras locales, semejantes a la desconocida, mediante una compresión del colectivo de muestras utilizando el método de la transformada de Fourier (FT). Posteriormente, para cada parámetro de interés se calcula una base de datos modificada seleccionando un subgrupo de datos FT, y realiza una regresión lineal múltiple entre los datos espectrales modificados por la transformada de Fourier y los datos de referencia para cada muestra. Con esa nueva base de datos, el espectro de la muestra desconocida es modificado y comparado con cada una de las muestras del colectivo de calibración estableciéndose el índice de similitud (IS) (Pérez-Marín et al., 2007b).

Las muestras del colectivo de calibración que tienen un alto índice de similitud con la muestra desconocida son seleccionadas, y el valor predicho del parámetro de interés es calculado mediante una simple media aritmética de los valores analíticos de las muestras seleccionadas (Davies, 1999).

Por lo tanto, en el método CARNAC original, la selección de muestras se realiza en base a la información espectral junto con los valores de referencia para cada muestra. (Anderssen et al., 2003). No obstante, diversos autores han desarrollado variaciones del método CARNAC utilizando análisis de componentes principales o las longitudes de onda directamente en vez de la compresión de datos utilizando la transformada de Fourier (Davies, 2002; Fearn y Davies, 2003).

- Regresión Localmente Ponderada (LWR).

El algoritmo LWR, propuesto por Naes et al. en 1990, busca aquellas muestras del colectivo de calibración semejantes para cada nueva muestra desconocida desde un punto de vista espectral y es, entonces, cuando utiliza esas muestras locales para desarrollar una ecuación de regresión lineal local.

Este algoritmo se basa en un simple análisis PCA para medir la distancia entre dos muestras y una regresión lineal. Sin embargo, hay varios parámetros que pueden variarse en el desarrollo del modelo (Naes et al., 2002):

- Función empleada para la medida de la distancia entre las muestras del colectivo de calibración y la desconocida. Existen muchos tipos de funciones, aunque las más empeladas son la función de la distancia euclídea o la de Mahalanobis. La distancia euclídea da el mismo peso en todas las direcciones del espacio espectral, mientras la distancia de Mahalanobis proporciona un mayor peso a la componente de la dirección principal del espacio espectral que en las otras.
- Función empleada para el cálculo de los pesos de cada muestra que se utilizarán en el desarrollo de la regresión lineal en función de su distancia espectral a la muestra a predecir. Normalmente, los pesos de cada muestra son determinados en concordancia a la lejanía de la muestra a predecir mediante una función cúbica:

$$W(d) = (1 - d^3)^3; \quad 0 \leq d \leq 1$$

donde d es la distancia de la muestra a predecir a las muestras de calibración.

- Número componentes principales del análisis PCA y número de muestras locales que se utilizarán en la regresión local.
- Algoritmo LOCAL de Shenk y Westerhaus

El algoritmo LOCAL de Shenk et al. (2001), incorporado en el software WinISITM, actúa de forma similar al algoritmo LWR aunque el criterio para seleccionar las muestras locales se basa en el coeficiente de correlación

existente entre la muestra desconocida y cada uno de los individuos del colectivo de datos, de modo que aquellos que presentan una mayor correlación con la muestra a determinar son elegidos para constituir el colectivo de muestras locales.

Como en el caso del algoritmo LWR, un parámetro a determinar con este algoritmo es el número de muestras locales a seleccionar, ya que la capacidad predictiva del modelo se verá afectada.

Una vez definido este parámetro, el algoritmo procede al desarrollo de la ecuación de predicción local mediante la aplicación del método de regresión PLS. Como método basado en el cálculo de unas variables latentes para definir la ecuación de predicción, la selección del número óptimo de factores es fundamental. Shenk et al. (1997) proponen que para la utilización del algoritmo LOCAL, la selección del número óptimo de LVs debe basarse en el cálculo de unos pesos que ponderan el tamaño de los coeficientes de regresión para cada factor PLS y el tamaño de los residuales del espectro de la muestra analizada, en vez de utilizar otros criterios como validación cruzada.

- Algoritmo Central Local (LCA)

Este algoritmo, propuesto por Zamora-Rojas et al. (2010), combina un análisis PCA y de distancias de Mahalanobis para seleccionar aquellas muestras espectralmente más similares a las que se quiere predecir. Posteriormente, el valor predicho es calculado como la media de los valores de referencia de las muestras localmente seleccionadas en el paso anterior. Al igual que en los casos anteriores, la selección del número de componentes principales como del número de muestras locales puede afectar a la capacidad predictiva de los modelos.

b.4. Maquinas de Vectores Soporte (SVM).

Desarrollados en una primera etapa por Vapnik y Chervonenkis (1964) para clasificación y discriminación; posteriormente, se extendió la teoría al contexto de modelos cuantitativos no lineales (Vapnik, 1998).

Estos modelos de aprendizaje en base a la experiencia cuentan con una serie de algoritmos que analizan datos y reconocen patrones. La estrategia de aprendizaje, basada en vectores soporte, se fundamenta en el aprendizaje estadístico, es decir, que modelos matemáticos dotados de estrategias de entrenamiento puedan maximizar la capacidad de generalización del modelo. Al basarse la función objetivo en una función cuadrática, su optimización implica un solo mínimo, en contraste con las redes neuronales en las que la función objetivo posee varios mínimos locales (Smola y Schölkopf, 2004). SVM no busca únicamente minimizar el error de predicción, sino que, asimismo, trata de minimizar la magnitud de los coeficientes y, por tanto, la varianza excesiva que puede obstaculizar la generalización del modelo.

Una alternativa a SVM fue propuesta por Suykens y Vandewalle (1999), denominada máquina de vectores soporte con mínimos cuadrados (LS-SVM, *Least Square Support Vector Machine*). Esta sustituye la función objetivo por una función cuadrática de la que derivan restricciones de igualdad. LS-SVM resulta más eficiente computacionalmente hablando que SVM.

3.3.4.5. Modelos cualitativos

Estos algoritmos tienen su principio en el reconocimiento de patrones dado que la mayoría se usan para clasificación según categorías, calidades o propiedades de las muestras. La mayoría de ellos parten del cálculo de las similitudes entre una muestra y otra. Los algoritmos más utilizados se pueden clasificar en métodos supervisados (hay un conocimiento previo en cuanto a asociaciones entre muestras) o no supervisados (no hay información previa del colectivo) (Figura 3.20). A continuación se describen los algoritmos más empleados en el análisis cualitativo de datos espectrales en el infrarrojo cercano:

a. Métodos no supervisados

Los métodos no supervisados consideran que aquellas muestras cercanas son similares y, por tanto, pertenecerían al mismo grupo (Wise et al., 2006).

El algoritmo KNN (*K-Nearest Neighbor*) de análisis de clúster es un ejemplo típico de este tipo de algoritmos cualitativos. KNN calcula la distancia entre muestras y, según la regla de agrupación (distancia media, mínima, etc.) las K muestras que presenten valores menores se considerarían del mismo grupo. De modo que el valor de referencia de las muestras seleccionadas tiene un peso en función de la distancia a la muestra desconocida para determinar la clase a la que pertenece (Silverman y Jones, 1989). Este simple método, no obstante, no informa cuando una muestra se ajusta o no al colectivo global.

b. Métodos supervisados

Los métodos supervisados se basan en el conocimiento a priori sobre el colectivo de muestras y las categorías involucradas. Análisis Discriminante por Mínimos Cuadrados Parciales (PLSDA, *Partial Least Square Discriminant Analysis*), Modelado Independiente Suave de Analogía de Clases (SIMCA, *Soft Independent Modeling of Class Analogy*) y Análisis de Variables Canónicas (CVA, *Canonical Variate Analysis*) son ejemplo de este

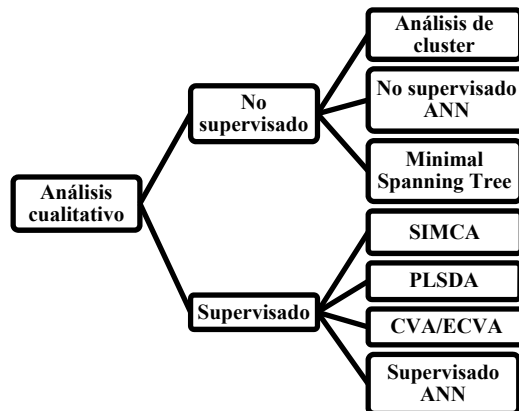


Figura 3.20. Clasificación general de algoritmos multivariantes para propósitos cualitativos.

Fuente: Elaboración propia

tipo de algoritmos. Más recientemente, se han incorporado algoritmos basadas en redes neuronales y máquinas de vectores soporte cuyas características son muy similares a las expuestas en los modelos cuantitativos.

- Análisis Discriminante por Mínimos Cuadrados Parciales (PLS-DA)

PLS-DA busca correlacionar las variaciones espectrales (X) con las clases definidas (Y), tratando de maximizar la covarianza entre los dos tipos de variables para diferenciar entre los grupos y omitir la variación dentro de una clase. Con este tipo de enfoque existe una matriz *dummy* (Y) formada por números arbitrarios asignados a las distintas clases que se distinguen (Naes et al., 2002).

El software WinISITM incorpora una variación propia de este algoritmo, denominada comercialmente ISI PLS2. Este algoritmo patentado se diferencia de PLS-DA en que trabaja con modelos desarrollados para dos categorías a la vez (clase de interés y el resto de clases como un único grupo), mientras que en PLS-DA hay un bloque en la matriz Y para cada clase, realizando los cálculos para cada categoría de ese modo y después mediante distintos estadísticos asigna la clase a la muestra a predecir.

- Modelado Independiente Suave de Analogía de Clases (SIMCA)

SIMCA es un algoritmo de reconocimiento de patrones supervisado que se basa en el desarrollo de un modelo PCA para cada una de las clases o categorías del colectivo en el que se proyecta a la muestra a predecir. Posteriormente, la muestra desconocida se compara con cada modelo PCA desarrollado, calculando sus valores residuales y Hotellings (Wold y Sjöström, 1977). En función de la distancia de la muestra dentro de cada modelo PCA, SIMCA asigna una clase a la muestra desconocida. La desventaja de este algoritmo es que una misma muestra puede predecirse como que pertenece a una categoría, ninguna o varias.

- Análisis de Variables Canónicas (CVA)

El algoritmo CVA calcula las direcciones en el espacio que maximizan las diferencias entre categorías. La limitación de este algoritmo es que es incapaz de trabajar con bases de datos donde el número de longitudes de onda sea mayor que el número de muestras y, además, las longitudes de onda tengan problemas de colinealidad (caso típico en NIRS) (Nørgaard et al., 2006). Una modificación de este algoritmo es ECVA (Análisis de Variables Canónicas Extendido, *Extended Canonical Variate Analysis*), propuesta por Nørgaard et al. (2006), para resolver esta limitación mediante el cálculo de un modelo PLS. De este modo, se trabajaría con unas nuevas variables reducidas y sin problemas de colinealidad que serían resumen de las primeras.

3.3.4.6. Validación de modelos NIRS y estadísticos asociados

Los modelos de calibración deben ser validados para evaluar su precisión, exactitud, reproducibilidad y robustez. Existen estrategias de validación cruzada (o validación interna) para evaluar estadísticamente los resultados obtenidos con un modelo de forma que parte del colectivo de calibración se divide en pequeños subgrupos donde de forma iterativa uno se utilizan para desarrollar el modelo y otros para evaluarlo. Finalmente, se calcula el error medio de los resultados de cada iteración para obtener un único valor de control del modelo.

No obstante, la estrategia ideal para evaluar un modelo multivariante de calibración se debe basar en un colectivo de validación externa o, lo que es lo mismo, que esté constituido por muestras no usadas en la calibración que sean representativas del producto y/o proceso. La norma ISO 12099:2010, basada en el trabajo pionero de Martens et al. (1989), recomienda que al menos ese colectivo de validación externo debe estar constituido por 10 muestras para la determinación correcta del sesgo y de al menos 20 para la determinación del Error Típico de Predicción (SEP, *Standard Error of Prediction*), de forma que se excluya una posible distribución normal de la varianza.

La evaluación de los modelos multivariantes NIRS basados en validación cruzada o externa se realiza en base a una serie de estadísticos, la mayoría de ellos normalizados y descritos en numerosas guías existentes sobre el uso y desarrollo de modelos NIRS en distintos campos como en la industria farmacéutica (Broad et al. (2002); ASTM E1655-05 (2012); EMEA (2012)) o en la industria de materias primas y piensos para alimentación animal (ISO 12099:2010). A continuación, se procede a una breve descripción de los estadísticos más frecuentes:

- Sesgo: error sistemático que puede deberse a muestras muy distintas del colectivo calibración, cambios en el instrumento, cambios en el análisis de referencia, cambios en el proceso o en el procedimiento de preparación de la muestra. Mide la media de los errores entre el valor NIRS y el valor de referencia.
- Error Típico (SE, *Standard Error*): estima la capacidad predictiva del modelo para un colectivo de muestras desconocida al calcular la diferencia media, corregida para el sesgo, entre los valores predichos (Y_i) y los de referencia (y_i) de un modelo de regresión cuando es aplicado a un colectivo de n muestras. Dependiendo del colectivo evaluado, el error será de calibración (SEC, *Standard Error of Calibration*), de validación cruzada (SECV, *Standard Error of Cross-Validation*) o de predicción (SEP, *Standard Error of Prediction*). En general, el error típico, independientemente del colectivo, se define como:

$$SE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - Y_i)^2}{n}}$$

En el caso del SEC no se divide por el número de muestras sino por el número de grados de libertad del modelo ($n-p$), siendo p el número de factores del modelo. Otro caso es el Error Típico de Laboratorio (SEL, *Standard Error of Laboratory*) que se refiere a la precisión (intra-laboratorio) o reproducibilidad (inter-laboratorio) del análisis realizado por un método de laboratorio.

- Raíz Media Cuadrática del Error Típico (RMSE, *Root Mean Square Error*): diferencia media entre los valores de referencia y los predichos por un modelo de regresión cuando es aplicado a un colectivo de n muestras, siendo e_i el residual de la muestra i . Incluye el sesgo.

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n e_i^2}{n}}$$

- RPD (*Ratio of Performance Deviation* o *Residual Predictive Deviation*): ratio entre la desviación estándar del valor de referencia del colectivo de calibración (DV_{ref}) y el Error Típico de Predicción (SEP). Sirve para determinar si un modelo es adecuado para su uso en rutina o no. Williams y Sobering (1996) recomiendan valores de este parámetro superiores a 3.

$$RPD = \frac{DV_{ref}}{SEP}$$

Algunas precauciones que hay que tener en cuenta con estos estadísticos es que RMSEP incluye el error aleatorio (SEP) y el error sistemático (sesgo), así como el error del método de referencia. Dado que no hay un test directo para poder comparar RMSEP y establecer unos límites de confianza, se utiliza mayoritariamente los valores de SEP que si lo permiten; por ejemplo, el test-F permite establecer los límites de confianza. Un valor de SEP puede ser aceptable si no es superior en un 30 % al valor del SEC. (ISO 12099:2010). Otros límites de control de las calibraciones desarrolladas se basan en que si el SEP es 1-1,5 veces superior al SEL es un modelo con una excelente precisión, si está entre 2-3 veces el SEL tiene una buena precisión, si es 4 veces el SEL tiene una precisión media y si es mayor de 5 veces el SEL tiene una pobre precisión. Criterios como que el sesgo no sea superior a 0,6 el SEC, que la pendiente sea como mínimo de 0,9 y tenga un coeficiente de determinación (R^2) de mínimo 0,6 también son empleados (Garrido-Varo et al., 2012). No

obstante, un error puede ser considerado admisible o no en función del tipo de aplicación que se esté desarrollando ya que dependerá de la exactitud y precisión del método de referencia, del rango de variabilidad cubierto por el modelo, el objetivo del análisis y las partes involucradas en la decisión (ISO 12099:2010).

Conviene indicar que estos errores típicos son una estima del error debido al ajuste matemático de los datos. Sin embargo, el error total de una predicción está compuesto por el error del método de referencia, el error de la medida espectral, el error del ajuste matemático y el error de muestreo.

También es importante considerar otros parámetros como el coeficiente de determinación (R^2) que informa sobre la intensidad de relación entre dos matrices de datos, es decir, determina el número de casos que resuelve el modelo o la variabilidad explicada.

En el caso de modelos cualitativos, se suele utilizar para evaluar la capacidad predictiva de los modelos el porcentaje de muestras correctamente clasificadas.

3.3.4.7. Estandarización de instrumentos y transferencia de calibraciones

Los modelos de calibración, tanto cuantitativos como cualitativos, desarrollados en un instrumento no pueden ser directamente transferidos a otro instrumento, incluso con el mismo diseño óptico, dado las pequeñas diferencias entre instrumentos (Dardenne, 2002). Los principales problemas que se plantean están relacionados con desplazamientos horizontales (diferencias en la localización de las bandas de absorción a lo largo del eje de abscisas) y verticales (diferencia entre los niveles de absorbancia por efecto aditivo, multiplicativo o combinación de ambos) de la señal espectral (Fearn, 2001).

En la mayoría de los casos se requiere de un ajuste previo de las bases de datos para llevar a cabo estrategias de estandarización de instrumentos y transferencias de calibraciones. Fearn (2001), Feudale et al. (2002) y Shenk (2004) han realizado trabajos de revisión que resumen los distintos algoritmos y metodologías (algoritmo patentado por Shenk y Westerhaus, Estandarización Directa (DS, *Direct Standardization*), Estandarización Directa por Tramos (PDS, *Piecewise Direct Standardization*), Transferencia basada en Proyección Ortogonal (TOP, *Transfer by Orthogonal Projection*), entre otras) desarrollados en este campo para transformar modelos o bases de datos medidos en unos instrumentos para que puedan ser usados en otros distintos. A continuación, se realiza una sintética descripción de las principales características de los algoritmos más utilizados:

- Algoritmo patentado de Shenk y Westerhaus

Es el primer algoritmo de estandarización de instrumentos NIRS en base a la utilización de información espectral. Este algoritmo, propuesto por Shenk y Westerhaus (1991c, 1992) e incorporado en el software WinISI™, realiza una corrección univariante del espectro completo mediante una primera corrección del desplazamiento horizontal seguida de una corrección de la intensidad espectral. Una descripción del proceso matemático se encuentra en Bouveresse et al. (1994).

- Estandarización Directa (DS) y Estandarización Directa por Tramos (PDS)

Ambos algoritmos se basan en transformaciones lineales basadas en la expresión $x^a = xF + b$, donde el vector x contiene los espectros originales y el vector x^a contiene los espectros estandarizados, b es el vector que contiene el *offset* y F es la matriz de estandarización. Esta matriz de estandarización se calcula mediante un modelo de regresión local PLS para cada longitud de onda entre ambos instrumentos a estandarizar.

En el caso del algoritmo PDS (Wang et al., 1992), los modelos locales multivariantes son calculados para cada ventana espectral alrededor de una determinada longitud de onda (tramo), mientras que en DS (Wang et al., 1991) es individual para cada longitud de onda, lo que implica un mayor riesgo de sobreajuste.

- Transferencia por Proyección Ortogonal (TOP)

Este algoritmo, propuesto por Andrew y Fearn (2004), busca ortogonalizar los espectros de la calibración en aquellas direcciones del espacio espectral donde sea mayor la variabilidad entre instrumentos. De este modo, al eliminar esa información, relacionada con las variaciones instrumentales en los espectros, se puede desarrollar modelos de calibración estandarizados.

Un aspecto importante en el desarrollo de metodologías de estandarización entre instrumentos NIRS, junto con la selección del algoritmo de estandarización, se refiere a la selección del número y tipo de muestras de estandarización. Tradicionalmente, se han empleado muestras artificiales o referencias genéricas (estables y con densidades ópticas en el mismo rango que el material a analizar) (Shenk, 2004). No obstante, dichas muestras no recogen toda la variabilidad espectral y densidades ópticas que un determinado producto, como en el caso de los agroalimentarios, puede tener y, por lo tanto, ser un factor limitante en el desarrollo de la estandarización (Dardenne et al., 1992; Bouveresse et al., 1994, García-Olmo et al., 2001). Por ello, algunos autores recomiendan el uso de muestras idénticas a las muestras de la base de datos que se quiere transferir para que la variabilidad intrínseca del producto quede reflejada en la matriz de estandarización (Fearn, 2001). En cuanto al número de muestras, se ha de indicar que el colectivo de estandarización debe

aportar información suficiente con respecto a las diferencias instrumentales. Este factor está condicionado por la complejidad de las diferencias instrumentales y el algoritmo de estandarización seleccionado (Bouveresse y Massart, 1996)

En los procesos de estandarización entre dos equipos siempre se establece uno de ellos como máster (equipo que se usa como modelo) y el otro como satélite (equipo cuyos espectros se quieren modificar para que se parezcan a los del equipo máster). Tradicionalmente, el equipo con mejores características ópticas y que proporciona modelos más exactos y precisos es usado como máster. Si bien esta es una estrategia muy adecuada y que proporciona buenos resultados, puede resultar tediosa y lenta para aplicaciones *in situ* en la industria, ya que se debe aplicar de forma individual a cada nuevo espectro la matriz de estandarización para poder obtener las predicciones; además de que algunas muestras deben ser medidas en los dos equipos para poder mantener las calibraciones actualizadas. Por eso, existe una nueva tendencia para simplificarlos a nivel procedimental, de forma que el instrumento seleccionado como máster sea el equipo que va a ser utilizado en rutina (ejemplo: equipo portátil para análisis *in situ*) y el equipo satélite sea aquel en el que se ha generado la librería durante años (ejemplo: equipo monocromador de laboratorio). De esta forma, las predicciones de nuevas muestras son mucho más rápidas, computacionalmente hablando, y aquellos espectros de muestras anómalas o interesantes por sus características pueden ser incorporados directamente en los modelos de calibración para hacerlos cada vez más robustos. Esta propuesta fue expuesta en algunas de sus reflexiones por el Dr. John Shenk en su página web¹⁵.

La complejidad de las estrategias de estandarización va en aumento conforme nuevos instrumentos aparecen en el mercado, como los equipos portátiles MEMS-NIRS, ya que sus características ópticas y espectrales difieren de otros equipos ya implantados e insaturados en la industria. Por eso, aspectos importantes a tener en cuenta son los rangos de longitudes de onda comunes entre ambos instrumentos y las resoluciones o intervalos entre longitudes de onda. Normalmente son necesarios procedimientos matemáticos previos de interpolación para que las librerías espectrales, o en un sentido más matemático, las matrices de datos, tengan las mismas características.

3.3.5. La espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano en el control de calidad de productos cárnicos.

El potencial de la tecnología NIRS para el análisis de grasas animales y carnes ha sido examinado por numerosos investigadores. Existen diversas revisiones específicas relacionadas con el control de calidad de productos cárnicos mediante tecnología NIRS que van desde la predicción de parámetros

¹⁵ <http://www.shenkanalytical.com/>

químicos, físicos, tecnológicos y sensoriales, autenticación/clasificación en diferentes categorías a otros aspectos relacionados con la seguridad alimentaria y vida útil, tanto en aplicaciones de laboratorio como en industria (Garrido-Varo et al., 2004, Prevolnik et al., 2004, Prieto et al., 2009 y Weeranantanaphan et al., 2011).

Concretamente, esas revisiones resumen los estudios más relevantes y actuales referentes a la predicción de la composición química en productos cárnicos, los cuales se han centrado en parámetros como proteína, grasa (intramuscular y ácidos grasos) y humedad principalmente, aunque también se han investigado otros compuestos como almidón, energía bruta, colesterol mioglobina, colágeno y contenido mineral; parámetros físico-tecnológicos como pH, color (L^* , a^* y b^*), capacidad de retención de agua, pérdida por goteo, fuerza de corte y fuerza de Warner-Bratzler; parámetros sensoriales como color, forma, veteado, olor, sabor, jugosidad, terneza y firmeza; y análisis cualitativos referentes a la identificación de regímenes alimenticios, sistemas productivos, genotipos, color, congelación/descongelación y mezclas de músculos (Prevolnik et al., 2004, Prieto et al., 2009 y Weeranantanaphan et al., 2011). Bien es cierto, que el éxito de la tecnología NIRS para todos estos parámetros no es igual.

Estas revisiones indican que la espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano tiene un alto potencial para predecir parámetros químicos en productos cárnicos, principalmente grasa, proteína y humedad, al igual que clasificar estos productos en distintas categorías. En contraste, la tecnología NIRS tiene una limitada capacidad predictiva para estimar parámetros tecnológicos y sensoriales, debido principalmente a la necesidad de manipular las muestras para su análisis NIRS, la heterogeneidad de los productos cárnicos, la baja precisión de los métodos de referencia como a la subjetividad de los evaluadores de los paneles de cata.

Hay que tener en cuenta que dependiendo del producto cárnico, los parámetros más interesantes para su estudio son distintos. Mientras en porcino, la mayoría de las investigaciones han tratado la posibilidad de determinar, principalmente, parámetros tecnológicos como pH y capacidad de retención de agua, así como composición química; en vacuno, se han enfocado a la predicción de parámetros químicos y terneza; en cordero, conejo y pollo, la mayoría se refieren a parámetros químicos o a algunas características propias de estas especies como puede ser la detección de restos fecales en pollo; en pescado, principalmente se han estudiado parámetros químicos como el contenido grasa.

El análisis NIRS de productos cárnicos se puede realizar en distintos modos de análisis (transmisión, reflectancia, transreflectancia e interactancia), si bien en todos ellos se ha observado la complejidad de obtener espectros de alta calidad sobre todo por su naturaleza heterogénea (presencia de tejido conectivo, grasa

intramuscular, fibras proteicas, etc.) y ser productos sólidos con un alto grado de humedad (Weeranantanaphan et al., 2011). Por eso, la mayoría de las investigaciones se han realizado en producto fundido, picado y homogenizado.

Como se indica en los objetivos de esta tesis doctoral, el análisis *in situ* de canales mediante tecnología NIRS es uno de los aspectos a investigar en este trabajo. Por ello, esta revisión bibliográfica se centra en investigaciones donde se evalúe la tecnología NIRS para el análisis de canales de animales, ya que un enfoque más general quedaría fuera de los objetivos de esta tesis doctoral, así como repetiría información que se encuentra sintetizada en las recientes revisiones publicadas en la literatura. No obstante, dada la particularidad del sector del cerdo ibérico, en esta sección también se recoge una síntesis de la literatura científica referida a la utilización de la tecnología NIRS para el control de calidad y autenticación (según régimen alimenticio/sistema productivo) de productos derivados de cerdos ibéricos.

En los últimos años es cuando mayor número de publicaciones se han producido en relación al análisis de tecnología NIRS en productos cárnicos intactos, tanto en el laboratorio como a nivel industrial. Prieto et al. (2009) y Weeranantanaphan et al. (2011) hacen una completa revisión en este aspecto. No obstante, otro aspecto necesario a mencionar, ya que no se recoge en las revisiones citadas, se refiere a los estudios pioneros que se están desarrollando en el campo de imágenes hiperespectrales NIRS (NIRS+ imagen) para el control de productos cárnicos. Esta tecnología ha demostrado su potencial para clasificar, de forma no destructiva, carnes de cerdo por aspectos tecnológicos como RFN (*reddish-pink, firm and non-exudative*), DFD (*dark purplish red, firm and dry*) o PSE (*pale/inkish-gray, soft and exudative*); además de predecir otros atributos como color, exudación, pH y veteado (Qiao et al., 2007a, 2007b y 2007c; Barbin et al., 2012). En pollo, se ha utilizado como sistema de inspección en tiempo real en la línea de faenado de canales para detectar contaminaciones con bacterias fecales (Chao et al., 2011).

Recientemente se han publicado dos estudios que muestran, en condiciones reales de la industria, la medida por imagen de interactancia en el infrarrojo (Figura 3.21) de recortes no homogéneos de carne de cerdo y vacuno, respectivamente, para la predicción de su contenido graso (O'Farrell et al., 2010; Wold, et al., 2011). Los modelos PLS desarrollados mostraron un alto coeficiente de determinación (alrededor de 0,98) para este parámetro con RMSEP entre 2,82 y 3,4 % para cerdo y de 3,0 % para vacuno, aunque en condiciones reales los autores estimaron que estos son algo superiores.

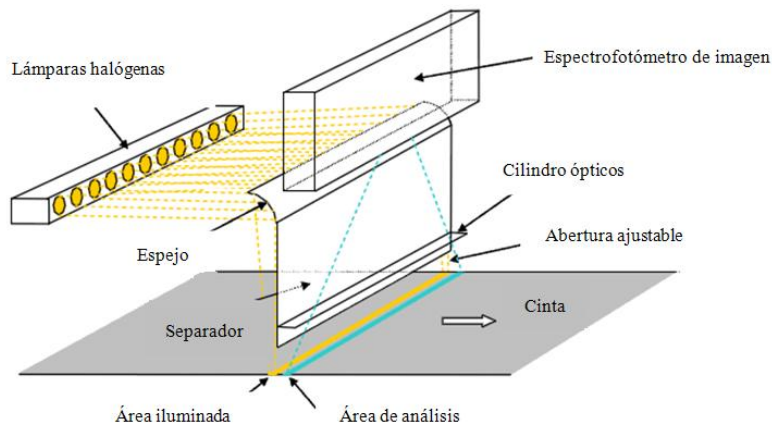


Figura 3.21. Esquema del sistema de escaneo de imágenes NIRS. Adaptado de O'Farrell et al., 2010.

No obstante, pocos son los trabajos que se basan en el análisis NIRS directamente en la canal. Mitchell et al. (2005) utilizó un equipo de sonda de fibra óptica (Futrex) para medir, a tres longitudes de onda (890, 930 y 940 nm), 120 canales de cerdo yorkshire-duroc en tres localizaciones con la piel afeitada



Figura 3.22. Imagen del equipo "Nitfom Fat Quality Grading System". (Sørensen et al., 2012).

(punto medio de la canal, jamón y paleta). Sus resultados mostraron la gran influencia que tenía en el espectro la composición de la piel, aunque obtuvieron un R^2 de 0,71 para la predicción del contenido lipídico, mejorable cuando en el modelo se incluye como variable el peso vivo del animal ($R^2= 0,93$). Hoving-Bolink et al. (2005) también analizaron canales de cerdos (yorkshire cruzado con pietrain) en la línea de faenado utilizando, en este caso, un equipo de red de diodos que trabaja en el rango de longitudes de onda de 380 a 1.700 nm (Zeiss MCS 511/522). Ciento treinta canales fueron analizadas en tres localizaciones (*M. longissimus thoracis*, *M. longissimus lumborum* y *M. semimembranosus*) para determinar el potencial de la tecnología NIRS en la estima de parámetros como pérdidas por goteo, color, terneza y contenido de grasa intramuscular. Sus resultados sólo indicaron la posibilidad de predecir el contenido de grasa intramuscular con un R^2 de 0,35, usando MLR, y un SEP de 3,6 g/kg. Más recientemente, Sørensen et al. (2012) publicaron un estudio en el que analizaron canales de cerdo con un prototipo de equipo NIRS con sonda de transmisión, denominado Nitfom (Figura 3.22), que trabaja en el rango 1.100 - 2.200 nm. Las sondas tienen forma puntiaguda y cuentan con un pequeño cuchillo para poder penetrar en la canal, de forma que los espectros se toman de la grasa subcutánea. Un ensayo con 35 canales

de cerdo, para estimar el índice de yodo, mostró un R^2 de 0,83 y un RMSECV de 1,44. Posteriormente, este modelo se aplicó a 30 canales para conocer la distribución espacial del índice de yodo en el cuerpo del animal. De este modo, mediante una extrapolación de los valores predichos con modelos desarrollados para un determinado punto de análisis, desarrollaron un mapa mostrando la distribución espacial de ese parámetro en la canal (Sørensen et al., 2013).

Por otra parte, Pérez-Marín et al. (2009a) evalúan el potencial de un equipo NIRS de sonda de fibra óptica (LabSpec Pro A108310 de Analytical Spectra Device, Inc.) para la predicción del contenido de los cuatro principales ácidos grasos (oleico, linoleico, palmítico y esteárico) presentes en el tejido adiposo subcutáneo de cerdo ibérico. Brevemente resaltar, ya que este artículo se describe y discute con posterioridad al utilizar canales de cerdo ibérico, que los autores demuestran la viabilidad del análisis NIRS *in vivo* y de canales para la estima de estos ácidos grasos, aunque muestran una pérdida de capacidad predictiva en relación a otros modos de análisis y presentación de la muestra.

En general, los trabajos hasta aquí realizados utilizan un número reducido de muestras muy diferente, por lo que resulta difícil el obtener conclusiones generalizables a otras canales, instrumentos y parámetros analíticos de interés en la industria porcina.

Si nos centramos en la aplicación de la tecnología NIRS en el sector del cerdo ibérico, podemos encontrar trabajos tanto cuantitativos (ejemplo: predicción de parámetros de composición en carne, predicción del perfil de ácidos grasos en grasa o tejido adiposo porcino) (Tabla 3.1) como cualitativos (ejemplo: predicción de la categoría comercial) (Tabla 3.2).

El primer artículo en este campo fue publicado por De Pedro et al. (1992) donde se demostró el potencial del análisis NIRS para desarrollar modelos multivariantes cuantitativos que permiten predecir el perfil de ácidos grasos en muestras de grasas de CI fundidas utilizando el modo de transmisión. Estos resultados iniciales permitieron el avance en este campo, aunque posteriores publicaciones obtuvieron mejores resultados en cuanto a la predicción del perfil de ácidos grasos en muestras de grasas de cerdo ibérico fundidas mediante el empleo de monocromadores trabajando en transflectancia junto con el uso de algoritmos multivariantes de regresión (PLS) en vez del análisis por transmisión y el desarrollo modelos lineales de regresión (García-Olmo et al., 2001, 2002; González-Martín et al., 2002a, 2003; Fernández-Cabanás et al., 2007; Pérez-Marín et al., 2007a, 2010a).

Posteriormente, el interés científico se orientó al desarrollo de aplicaciones más simples, rápidas y no destructivas para su implantación en la industria, al igual que ocurrió con otros productos cárnicos como se ha expuesto anteriormente, mostrando la viabilidad de la tecnología NIRS para analizar

muestras de tejido adiposo intacto usando monocromadores equipados con fibras ópticas u otros equipos portátiles y de menor tamaño de más reciente aparición (García-Olmo et al., 1998; De Pedro et al., 2001, 2007; González-Martín et al., 2003; Pérez-Marín et al., 2009a).

Garrido-Varo et al. (2004) revisaron detalladamente los avances desarrollados con la tecnología NIRS en estudios cuantitativos para predecir el perfil de ácidos grasos en productos de cerdo ibérico (grasa fundida e intacta). Ellos indicaron que los errores más bajos obtenidos para el análisis de grasa fundida fueron obtenidos en modo de transreflectancia. No obstante, posteriormente, distintos autores han confirmado la viabilidad de esta tecnología tanto en muestras de grasas fundidas, si bien resaltan la influencia que distintas fuentes de variabilidad (conocidas y no conocidas) pueden tener sobre la robustez de los modelos (Pérez-Marín et al., 2007a, 2010a), como en muestras de grasa intacta, e incluso con otras piezas de la canal como lomo (González-Martín et al., 2005) o productos derivados como salchichón (Fernández-Cabanás et al., 2011).

La Tabla 3.1 resume los errores, tanto de validación cruzada como externa, para predecir el perfil de ácidos grasos por NIRS en productos derivados del cerdo ibérico (grasa, tejido adiposo y carne). También se incluyen estudios similares realizados con otras razas porcinas no ibéricas (Ripoche y Guillard, 2001; Pérez-Juan et al., 2010; Gjerlaug-Enger et al., 2011) poniendo de manifiesto el rango normal de errores que se obtienen en este tipo de aplicaciones NIRS. Estas investigaciones han demostrado el potencial de la tecnología NIRS para reemplazar al análisis GC, que es caro y lento, en la cuantificación del perfil de ácidos grasos en muestras de grasa (teniendo en cuenta las limitaciones en exactitud frente a esa técnica de referencia), parámetros muy importantes en el sector del cerdo ibérico dado su uso para autentificar/clasificar canales de cerdo ibérico en distintos regímenes alimenticios; además de su posible utilización como información nutricional en el etiquetado

Los últimos avances en este campo fueron publicados por Pérez-Marín et al. (2009a), como se indicó anteriormente, al demostrar la viabilidad de poder realizar el análisis *in vivo* mediante NIRS de animales ibéricos para predecir cuantitativamente el perfil de ácidos grasos (oleico, palmítico, esteárico y linoleico). Bien es cierto que los errores de esta medida analítica frente a otros modos de análisis NIRS y formas de presentación de la muestra (a través de la piel en la canal, en una muestra de tejido subcutáneo o en la sección transversal del tejido adiposo) son mayores (Tabla 3.1).

Otra aplicación NIRS en el sector del cerdo ibérico que ha sido ampliamente evaluada, dada la particularidad del sector en cuanto a las categorías comerciales definidas en la legislación española, se basa en el análisis NIRS y desarrollo de modelos multivariantes cualitativos como sistema de

clasificación/autenticación de canales de cerdos ibéricos según régimen alimenticio (Garrido-Varo et al., 2004). Estos modelos se fundamentan en el uso de toda la información espectral, es decir, la información utilizada para discriminar entre categorías no sólo se basaría en la información química relacionada con los cuatro ácidos grasos principales, sino que otras características particulares de cada categoría serían consideradas en los modelos al estar recogidas en el espectro (esta es una aproximación similar a la propuesta alternativa al análisis GC para los 4 ácidos grasos principales presentada por De Pedro (2001) que propone utilizar todo el perfil lipídico para considerar otras posibles características vinculadas al régimen alimenticio).

Tabla 3.1. Investigaciones sobre espectroscopía del infrarrojo cercano (NIRS) para predecir cuantitativamente el perfil de ácidos grasos en grasas y carnes de cerdo ibérico.

Artículo	Presentación de la muestra	Instrumento	Modo de análisis	Rango / resolución (nm)	Número de muestras (cal./val.) [^]	SECV / SEP ⁺ (%)			
						Palmítico (C16:0)	Esteárico (C18:0)	Oleico (C18:1)	Linoleico (C18:2)
García-Olmo, 2002	Error típico de laboratorio (GC) ^Δ	-	-	-	20	0,26 ^Δ	0,22 ^Δ	0,25 ^Δ	0,15 ^Δ
De Pedro et al., 1992	Grasa fundida (en microondas)	PSCO 62500	Transmisión	1.100-2.500 / 2	83	0,43	0,58	0,59	0,36
García-Olmo et al., 2001	Grasa fundida (en microondas)	Foss NIRSystems 6500	Transflectancia	1.100-2.500 / 2	352	0,26	0,28	0,26	0,15
Ripoche & Guillard, 2001*	Grasa fundida	FT Bomem MB 100	Transmisión	7.342-6.756 cm ⁻¹ + 5.927-5.390 cm ⁻¹ + 4.728-4.604 cm ⁻¹ / 8 cm ⁻¹	95	0,49	0,63	0,58	0,51
González-Martín et al., 2002a	Grasa fundida (extracción con disolventes)	Foss NIRSystems 5000	Transflectancia	1.100-2.498 / 2	115/20	0,66/0,46	0,54/0,41	1,15/0,69	0,49/0,29
	Grasa fundida (en microondas)			1.100-2.498 / 2	115/20	0,48/0,34	0,65/0,42	1,13/0,73	0,59/0,32

^Δ Error típico de laboratorio de 20 muestras de grasa de cerdo ibérico analizadas en duplicado por cromatografía de gases (GC).

* Muestras no ibéricas.

[^] En caso de aparecer un sólo número, este se corresponde con el número de muestras de calibración.

⁺ En caso de aparecer un sólo número, este se corresponde con el SECV.

Fuente: Elaboración propia

Tabla 3.1. Investigaciones sobre espectroscopía del infrarrojo cercano (NIRS) para predecir cuantitativamente el perfil de ácidos grasos en grasas y carnes de cerdo ibérico (continuación).

Artículo	Presentación de la muestra	Instrumento	Modo de análisis	Rango / resolución (nm)	Número de muestras (cal./val.) [^]	SECV / SEP ⁺ (%)			
						Palmítico (C16:0)	Esteárico (C18:0)	Oleico (C18:1)	Linoleico (C18:2)
González-Martín et al., 2003	Tejido adiposo intacto (laboratorio)	Foss NIRSystems 5000	Sonda de fibra óptica	1.100-2.000 / 2	157/23	0,73/0,60	0,79/0,84	1,18/1,20	0,52/0,77
	Grasa fundida (en microondas)		Transflectancia	1.100-2.498 / 2	157/23	0,55/0,59	0,61/0,58	1,06/0,97	0,59/0,77
Fernández et al., 2003	Grasa fundida (en microondas)	Foss NIRSystems 6500	Transflectancia	800-2.200 / 2	6	0,65	0,42	0,87	0,44
González-Martín et al., 2005	Lomo intacto	Foss NIRSystems 5000	Fibra óptica	1.100-2.000 / 2	74/15	1,05/0,62	0,93/0,79	1,09/0,73	1,14/0,87
Fernández-Cabanás et al., 2007	Grasa fundida (en microondas)	Foss NIRSystems 6500	Transflectancia	1.100-2.498 / 2	311/30	0,18/0,37	0,22/0,26	0,22/0,57	0,15/0,27
Pérez-Marín et al., 2007a	Grasa fundida (en microondas)	Foss NIRSystems 6500	Transflectancia	1.100-2.500 / 2	188/12	0,24/0,27	0,29/0,32	0,20/0,31	0,16/0,32

[^] En caso de aparecer un sólo número, este se corresponde con el número de muestras de calibración.

⁺ En caso de aparecer un sólo número, este se corresponde con el SECV.

Fuente: Elaboración propia

Tabla 3.1. Investigaciones sobre espectroscopía del infrarrojo cercano (NIRS) para predecir cuantitativamente el perfil de ácidos grasos en grasas y carnes de cerdo ibérico (continuación).

Artículo	Presentación de muestra	Instrumento	Modo de análisis	Rango / resolución (nm)	Número de muestras (cal./val.) [^]	SECV / SEP ⁺ (%)			
						Palmítico (C16:0)	Esteárico (C18:0)	Oleico (C18:1)	Linoleico (C18:2)
Pérez-Marín et al., 2009a	<i>In vivo</i>	LabSpec Pro A108310 (ASD)	Sonda de fibra óptica	450-2.300 / 1	52	1,24	0,67	1,42	0,36
	Tejido adiposo intacto (canal)			450-2.300 / 1	52	0,82	0,94	1,48	0,55
	Tejido adiposo intacto (laboratorio)			1.100-2.300 / 1	52	0,65	0,54	1,05	0,35
Pérez-Marín et al., 2010a	Grasa fundida (en microondas)	Foss NIRSystems 6500	Transflectancia	1.100-2.500 / 2	188/60	0,30/0,34	0,26/0,31	0,26/0,39	0,15/0,58
Fernández-Cabanás et al., 2011	Salchichón loncheado	Foss NIRSystems 6500	Reflectancia	1.100-2.500 / 2	86	0,58	0,55	1,51	0,86
Pérez-Juan et al., 2010*	Tejido adiposo intacto (laboratorio)	FT Bruker Matrix-F	Sonda de fibra óptica	8.900-4.200 cm ⁻¹ / 8 cm ⁻¹	115/38	1,0 ^Φ /1,4 ^Φ	0,8 ^Φ /1,0 ^Φ	1,1 ^Φ /1,1 ^Φ	1,1 ^Φ /1,2 ^Φ
Gjerlaug-Enger et al., 2011*	Grasa fundida (en microondas)	Foss XDS NIR	Transflectancia	1.100-2.500 / 2	78/20	0,61 ^Φ /0,51	0,41 ^Φ /0,40	0,51 ^Φ /0,44	0,25 ^Φ /0,22

* Muestras no ibéricas.

[^] En caso de aparecer un sólo número, este se corresponde con el número de muestras de calibración.⁺ En caso de aparecer un sólo número, este se corresponde con el SECV. ^ΦValores RMSECV y/o RMSEP.

Fuente: Elaboración propia

La Tabla 3.2 muestra los resultados obtenidos con esta tecnología para una aproximación cualitativa. Hervás et al. (1994) evaluaron el uso de la información NIRS “per se” para clasificar cualitativamente muestras de grasa fundida aplicando redes neuronales artificiales (algoritmo no lineal) con porcentajes de muestras correctamente clasificadas en las tres categorías principales (“bellota”, “cebo” y “recebo”) por encima del 90 %. Por su parte, De Pedro et al. (1995) también evaluaron con éxito la clasificación NIRS cualitativa por régimen alimenticio analizando muestras de grasa fundidas de “bellota”, “cebo” y “recebo”, incluso con mejores resultados de discriminación que mediante la clasificación por los valores de 11 ácidos grasos analizados por GC. Más recientemente, García-Olmo et al. (2009) compararon modelos LDA para clasificar grasas fundidas de 5 categorías distintas, obteniendo mejores resultados con la aproximación cualitativa, que desarrollando modelos LDA basados en la composición de ácidos grasos como variables. Arce et al. (2009) también evaluaron el potencial de la tecnología NIRS para discriminar muestras de grasas subcutáneas fundidas de “bellota”, “cebo” y “pienso alto oleico”, utilizando algoritmos no supervisados para caracterizar bases de datos (PCA o análisis de agrupamiento jerárquico - HCA, *Hierarchical Cluster Analysis*) indicando que las muestras de “bellota” se encontraban agrupadas en un mismo grupo, mientras las de “cebo” y “pienso alto oleico” estaban juntas en otro, algo muy interesante ya que estos dos grupos realmente son considerados por la Norma de Calidad bajo la misma denominación. Además, un análisis basado en el algoritmo LDA, utilizando el espectro NIRS, separó bastante bien las tres categorías anteriores, donde sólo se clasificaron incorrectamente 4 muestras del grupo “cebo”; 3 como “bellota” y 1 como “pienso alto oleico” (Arce et al., 2009). Un comentario general para todos los estudios que se detallan en la Tabla 3.2 es el que los números de muestras de los modelos de calibración desarrollados son muy reducidos, no superando los colectivos de calibración más de 77 muestras y 25 los de validación.

Como se ha mencionado anteriormente, la tecnología NIRS puede ser empleada para predecir otros parámetros distintos del perfil de ácidos grasos o la categoría según el régimen alimenticio, aunque estos han sido los aspectos en los que la mayoría de estudios relacionados con el cerdo ibérico se han desarrollado, dada la particularidad del sector.

Tabla 3.2. Investigaciones basadas en Espectroscopía del Infrarrojo Cercano (NIRS) para clasificar productos derivados del cerdo ibérico según régimen alimenticio.

Artículo	Muestra	Instrumento	Modo de análisis	Rango / resolución (nm)	Tipo análisis	Número muestras				Porcentaje correctamente clasificado (%)			
						B	C	R	PAO	B	C	R	PAO
Hervás et al., 1994	Grasa fundida	NIRSystems 6250	Transmisión	1.100-2.498 / 2	Cualitativo	Cal:28 Val: 25	Cal:18 Val: 15	Cal: 18 Val: 14	-	96*	100*	93,9*	-
De Pedro et al., 1995	Grasa fundida	Foss NIRSystems 6500	Transflectancia	1.100-2.498 / 2	Cualitativo	Cal: 14 Val: 25	Cal: 25 Val: 14	Cal: 25 Val: 15	-	84*	100*	80*	-
García-Olmo et al., 2009	Grasa fundida	Foss NIRSystems 6500	Transflectancia	1.100-2.500 / 2	Cuantitativo [†]	Cal: 77	Cal: 13	Cal:31	-	89,9 [^]	100 [^]	97,6 [^]	-
					Cualitativo					100 [^]	100 [^]	100 [^]	
Arce et al., 2009	Grasa fundida	Foss NIRSystems 6500 (región NIRS)	Transflectancia	4.000-9.000 cm ⁻¹ / 8 cm ⁻¹	Cualitativo	22	24	-	12	100 [^]	83,3 [^]	-	100 [^]

Cal.: colectivo de calibración; Val.: colectivo de validación; B: “bellota”; C: “cebo”; R: “recebo”; PAO: “pienso alto oleico”.

[^]Resultados de validación cruzada.

*Resultados validación externa.

[†]Perfil de ácidos grasos obtenidos por predicción NIRS y utilizados como variables para los modelos de discriminación.

Fuente: Elaboración propia

La Tabla 3.3 recoge las principales publicaciones relacionadas con el desarrollo de aplicaciones NIRS para el control de calidad de parámetros de composición en productos cárnicos frescos y curados derivados del cerdo ibérico. Se observa que algunos trabajos han sido evaluados con un colectivo de muestras reducido y no han sido validados externamente los modelos, lo que hace que la mayoría de ellos puedan ser considerados, más bien, como estudios de viabilidad. En relación al tipo de presentación de muestra, se observa que el producto cárnico homogenizado presenta mejores resultados predictivos que la muestra picada sin homogenizar o intacta, siendo esta última la que mayor complejidad presenta. González-Martín et al. (2002b y 2009) han presentado estudios basados en la cuantificación de componentes minoritarios en productos cárnicos como hidroxiprolina o distintos minerales con unos resultados bastantes optimistas en relación al diseño experimental desarrollado en ellos, ya que hay que tener en cuenta que las concentraciones de esos elementos en la carne no superan los 100 µg/ml para el caso de los minerales ó 0,75 g / 100 g en cuanto a la hidroxiprolina.

En otro ámbito, la tecnología NIRS en el sector del CI también ha sido evaluada para clasificar músculos (*M. masseter*) de cerdo ibérico en función del genotipo (duroc frente a ibérico), con unos resultados muy prometedores al usarse modelos de clasificación basados en redes neuronales (Del Moral et al., 2009). Sin embargo, hay que tener en cuenta que el estudio se realizó con un reducido número de muestras (15 muestras de cerdos ibéricos puros (100 %) y 15 muestras de cerdos ibéricos cruzados con duroc). Además, la discriminación entre las muestras puede que no se deba solamente al genotipo, sino que el régimen alimenticio esté influyendo en los resultados dado que los animales ibéricos fueron alimentados en montanera, mientras los cerdos cruzados fueron engordados con piensos compuestos. Por otra parte, Guillén et al. (2010) realizaron un estudio similar al anterior para discriminar músculo de cerdo ibérico frente a porcino blanco (15 individuos de cada raza) utilizando redes neuronales y máquina de vectores soporte, con los que obtuvieron resultados muy prometedores.

En conclusión, diversas investigaciones han demostrado el potencial de esta tecnología y, actualmente, el sector del CI se está interesando más activamente en su implantación. Varios laboratorios analíticos oficiales y privados ofrecen actualmente entre sus servicios el análisis NIRS de grasas fundidas para la predicción cuantitativa de los cuatro principales ácidos grasos (oleico, palmítico, esteárico y linoleico). Los industriales más innovadores del sector de CI han implantado la tecnología NIRS como sistema de control de calidad interno para apoyar la toma de decisiones en compra de materias primas y venta de productos, además de emplear esta tecnología en cuestiones de marketing como sistema de control de calidad voluntario (Garrido-Varo, 2010; Serrano et al., 2012b). Si bien estas aplicaciones en el sector del CI están implementadas a nivel de laboratorio, ha habido algunos estudios científicos

que han demostrado la viabilidad de esta tecnología en aplicaciones industriales (*on-line/in-line*). No obstante, el desarrollo de la tecnología NIRS para el análisis *in situ* en el sector del CI se encuentra aún necesitado de importante investigación máxime teniendo en cuenta la aparición en el mercado de nueva instrumentación de vanguardia portátil y miniaturizada, que permite ser implantada en ambientes donde los diseños instrumentales tradicionales son inadecuados (Crocombe, 2004). Sistemas de apoyo a la toma de decisión en tiempo real, basados en medidas *in situ* o en la línea de faenado en combinación con algoritmos de tratamiento de la señal y tecnologías de la información y de la comunicación podrían ser una herramienta muy útil para asegurar la trazabilidad, autenticar y controlar la calidad de los productos de cerdo ibérico, con el objetivo de garantizar la homogeneidad de los mismos, satisfacer las expectativas de los consumidores y establecer un sistema fiable de control, aspecto que forma parte de los objetivos de esta tesis doctoral.

Tabla 3.3. Investigaciones sobre control de calidad en productos cárnicos derivados del cerdo ibérico basadas en Espectroscopía del Infrarrojo Cercano (NIRS).

Artículo	Muestra	Instrumento	Modo de análisis	Rango / resolución (nm)	Presentación muestra	Número de muestras		SECV/SEP ⁺			
						Cal. [^]	Val.	Grasa (%)	Proteína (%)	Humedad (%)	Hidroxi prolina (%)
González-Martín et al., 2002c	Lomo fresco	Foss NIRSystems 5000	Fibra óptica	1.100-2.000 / 2	Picado	56	-	0,524	0,444	-	-
					Intacto	56	-	0,744	0,806	-	-
Fernández et al., 2003	Lomo fresco	Foss NIRSystems 6500	Reflectancia	800-2.200 / 2	Homog.	¿	-	0,38	-	-	-
Ortiz-Somovilla et al., 2007	Masa de salchichón fresca	Pertem 7000	Reflectancia	515-1.650 / 5	Homog.	80	20	0,87/0,94	0,53/0,87	0,79/0,76	-
					Picado	80	20	1,35/1,38	0,61/0,83	0,99/1,0	-
González-Martín et al., 2009	Salchichón y chorizo	Foss NIRSystems 5000	Fibra óptica	1.100-2.000/ 2	Picado	80	12	-	-	-	0,07/0,05
Gaitán-Jurado et al., 2008	Salchichón curado	Pertem 7000	Reflectancia	515-1.650 / 5	Homog.	80	20	0,97/0,71	0,95/0,95	0,53/0,41	-
					Picado	80	20	1,36/1,47	0,91/1,08	1,03/0,97	-

Cal.: colectivo de calibración; Val.: colectivo de validación. Homog.: homogenizado.

[^] Número de muestras inicial sin tener en cuenta el análisis de espectros anómalos espectrales o químicos.

⁺ En caso de aparecer un sólo número, este se corresponde con el SECV.

Fuente: Elaboración propia

Tabla 3.3. Investigaciones sobre control de calidad en productos cárnicos derivados del cerdo ibérico basadas en Espectroscopía del Infrarrojo Cercano (NIRS) (continuación).

Artículo	Muestra	Instrumento	Modo de análisis	Rango / resolución (nm)	Presentación muestra	Número de muestras		SECV/SEP ⁺				
						Cal. ^	Val.	Fe (%)	Zn (%)	Ca (%)	Na (%)	K (%)
González-Martín et al., 2002b	Lomo fresco	Foss NIRSystems 5000	Fibra óptica	1.100-2.000/ 2	Picado	42	-	0,143	0,151	0,164	0,996	6,872
					Intacto	42	-	0,245	-	-	1,2	9,44

Cal.: colectivo de calibración; Val.: colectivo de validación.

^ Número de muestras inicial sin tener en cuenta el análisis de espectros anómalos espectrales o químicos.

+ En caso de aparecer un sólo número, este se corresponde con el SECV.

Fuente: Elaboración propia

MATERIALES Y MÉTODOS EXPERIMENTALES GENERALES



4. Materiales y métodos experimentales generales

La presente tesis doctoral está conformada por un compendio de publicaciones y estudios. En cada uno se detalla los materiales y métodos utilizados. No obstante, para dar una visión global de toda la investigación realizada y facilitar su lectura y comprensión, se ha considerado oportuno incluir este capítulo en el que se detallan de forma concisa los colectivos de muestras, instrumentación y programas informáticos utilizados para el desarrollo de todos los estudios que constituyen la presente tesis doctoral.

Las principales investigaciones que conforman este documento se pueden agrupar en tres grandes bloques: uno (bloque 1) relacionado con el diseño, desarrollo, evaluación y puesta a punto de procedimientos matemáticos-estadísticos y/o instrumentación NIRS portátil que permita la implantación de esta tecnología en el análisis *in situ* y de rutina de productos procedentes del cerdo ibérico (carne y grasa) en la industria de transformación (esto se corresponde con los objetivos 1, 2, 3 y 4); el segundo bloque (bloque 2) se corresponde a estudios científicos de carácter más básicos relacionados con la caracterización óptica del tejido cutáneo y adiposo de cerdo ibérico, así como la propagación de la radiación NIR en dichos tejidos, aspecto esencial para profundizar en el análisis NIRS no destructivo, no invasivo e *in vivo* de animales (objetivo 5); y el tercer bloque (bloque 3) que se centra en el desarrollo de un sistema informatizado de análisis de datos espectrales procedente de equipos portátiles MEMS-NIRS y de su integración en bases de datos almacenadas en la nube (objetivo 6). Esta subdivisión se utiliza en este apartado para describir de forma general los materiales y métodos utilizados en esta tesis doctoral.

- *Bloque 1: estudios referentes a objetivos 1, 2, 3 y 4.*

Los colectivos de muestras e instrumentos utilizados en los distintos trabajos que están relacionados con este bloque (apartados 5.1, 5.2, 5.3 y 5.4) aparecen descritos en la Tabla 4.1. Dichas muestras proceden de distintos proyectos de investigación del grupo ISPA de la Universidad de Córdoba desarrollados en estrecha colaboración con diversas empresas de transformación de productos del cerdo ibérico y mataderos.

Los estudios realizados con productos cárnicos (carne picada) de cerdo ibérico se han basado en el diseño de estrategias de recalibración y supervisión de modelos NIRS de rutina, así como su transferencia desde instrumentación NIRS de altas prestaciones a equipos portátiles. Por eso, el colectivo de

Tabla 4.1. Colectivos de muestras utilizados en los distintos estudios referentes a la implantación *in situ* de la tecnología NIRS en la industria de transformación del cerdo ibérico.

Muestra	Publicación / Estudio	Número de muestras	Propósito	Observaciones	Instrumento	Modo análisis/Tipo muestra
	5.1.1	1294	Supervisión y actualización de modelos cuantitativos NIRS	Procedente de 4 músculos diferentes: <i>gluteus medius</i> , <i>masseter</i> , <i>longissimus dorsi</i> , <i>spinalis dorsi</i> .	Foss NIRSystems 6500	Cápsula giratoria (carne picada)
Carne (picada)		342	Desarrollo de modelos cuantitativos NIRS	Proceden del estudio 5.1.1	Foss NIRSystems 6500	Cápsula giratoria (carne picada)
	5.4.1	235	Desarrollo y evaluación de estrategias de estandarización entre equipos NIRS de laboratorio y portátiles	Muestras de <i>longissimus dorsi</i>	Phazir™ 1640	Reflectancia (carne picada)

**Figura 4.1. Equipo Foss NIRSystems 6500 y cápsula giratoria utilizada para el análisis de carne picada.****Figura 4.2. Equipo Phazir™ analizando carne picada.**

Tabla 4.1. Colectivos de muestras utilizados en los distintos estudios referentes a la implantación *in situ* de la tecnología NIRS en la industria de transformación del cerdo ibérico (continuación).

Muestra	Publicación / Estudio	Número de muestras	Propósito	Observaciones	Instrumento	Modo análisis/Tipo muestra
Tejido adiposo subcutáneo	5.1.2	922	Supervisión y actualización de modelos cuantitativos NIRS	Muestras de distintos años	Foss NIRSystems 6500	Cápsula giratoria transflectancia (grasa fundida)
	5.1.3	786	Supervisión y actualización de modelos cuantitativos NIRS	Muestras de distintos años	Foss NIRSystems 6500	Fibra óptica (tejido adiposo intacto)

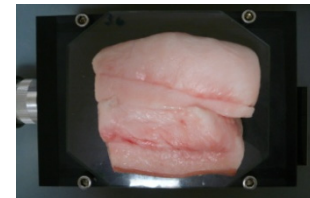
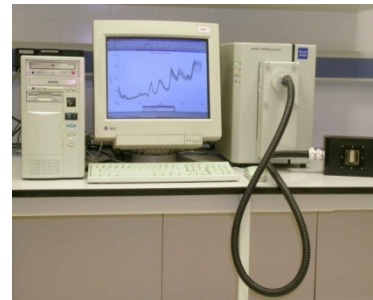
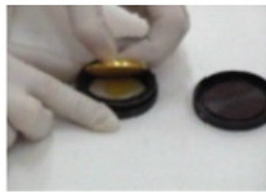


Figura 4.3. Equipo Foss NIRSystems 6500 y cápsula giratoria de transflectancia para el análisis de grasa fundida.

Figura 4.4. Equipo Foss NIRSystems 6500 y fibra óptica de interactancia para el análisis de tejido adiposo subcutáneo intacto.

Tabla 4.1. Colectivos de muestras utilizados en los distintos estudios referentes a la implantación *in situ* de la tecnología NIRS en la industria de transformación del cerdo ibérico (continuación).

Muestra	Publicación / Estudio	Número de muestras	Propósito	Observaciones	Instrumento	Modo análisis/Tipo muestra
Tejido adiposo subcutáneo (canal, intacta y fundida)	5.3.1	300	Desarrollo de modelos cualitativos NIRS <i>in situ</i> en la línea de faenado	100 animales de cada régimen alimenticio (“bellota”, “recebo” y “cebo”)	Foss NIRSystems 6500	Cápsula giratoria transreflectancia (grasa fundida)
					Foss NIRSystems 6500	Fibra óptica (tejido adiposo intacto)
					Phazir™ 1640	Reflectancia (canal)
	5.3.2	584	Desarrollo de modelos cualitativos NIRS <i>in situ</i> en la línea de faenado	Más de 180 animales de cada régimen alimenticio (“bellota”, “recebo” y “cebo”) y de distintas campañas	Phazir™ 1640	Reflectancia (canal)
	5.3.3	110	Desarrollo de modelos cuantitativos NIRS <i>in situ</i> en la línea de faenado	Animales de distintos regímenes alimenticios.	Foss NIRSystems 6500	Cápsula giratoria transreflectancia (grasa fundida)
					Foss NIRSystems 6500	Fibra óptica (tejido adiposo intacto)
Phazir™ 1640					Reflectancia (canal)	

muestras utilizado es bastante amplio, cubriendo diversos años y músculos. El otro producto evaluado en esta tesis doctoral es el tejido adiposo subcutáneo, analizado tanto directamente en la canal, intacto en el laboratorio o fundido para el desarrollo, aplicación, evaluación y validación de un sistema de control *in*

situ de calidad en productos derivados de cerdo ibérico en la industria de transformación/matadero mediante instrumentación NIRS portátil. Los colectivos de muestras de este producto analizados en el laboratorio (intacto y fundido) fueron también empleados para el desarrollo y evaluación de procedimientos/metodologías de supervisión y mantenimiento de modelos NIRS de rutina en estos productos.

Básicamente han sido empleados dos tipos de instrumentos: dos monocromadores de altas prestaciones científico-técnicas (Foss NIRSystems 6500) y un equipo portátil MEMS-NIRS (PhazirTM 1640). Los instrumentos Foss NIRSystems son equipos monocromadores de alta resolución que trabajan en condiciones controladas de laboratorio. Estos son los equipos más extendidos en el sector agroalimentario y, así como, los más empleados en las investigaciones NIRS relacionadas con el sector del cerdo ibérico e implementados en diversos laboratorios públicos y privados como servicio analítico al sector, tal y como se puede apreciar en las Tablas 3.1, 3.2 y 3.3. Por su parte, el instrumento MEMS-NIRS portátil evaluado en esta tesis doctoral (PhazirTM 1640) presenta entre sus principales características su reducido tamaño, ligereza, diseño compacto, integra un microprocesador y es de menor precio que los monocromadores (más detalles en la sección 3.3.2), lo que hace que sea factible su implantación en ambientes donde se lleva a cabo el proceso de fabricación o de despiece de piezas cárnicas. La Tabla 4.2 recoge las principales características de estos equipos.



Figura 4.5. Equipo PhazirTM 1640 analizando canales de cerdo ibérico en la línea de faenado.

Tabla 4.2. Principales características de los instrumentos utilizados.

Instrumento	Características principales
Foss NIRSystems 6500	Monocromador/Pre-dispersivo
	400-2.500 nm (rango)
	2 nm (resolución)
	1.875 ms (tiempo integración)
	60 s (medida con 32 escaneos/muestra)
	Altas prestaciones
	Condiciones de trabajo controladas (laboratorio)
Phazir™ 1640	Equipo MEMS/Pre-dispersivo
	1.600-2.400 nm (rango)
	~8 nm (resolución. No constante)
	600 ms (tiempo integración)
	3 s (medida con 5 escaneos/muestra)
	Portátil
	Compacto y robusto

Fuente: Elaboración propia

El análisis matemático-estadístico de los datos espectrales se ha realizado con distintos software, según el estudio. El software WinISI™ (Infrasoft International, Port Matilda, PA), que acompaña a los equipos Foss NIRSystems, fue utilizado para la recogida de espectros en estos equipos y su posterior tratamiento matemático-estadístico. Además, este software se empleó en los estudios 5.1.1, 5.1.2, 5.1.3., 5.3.1, 5.3.3 y 5.4.1 para el cálculo de la repetibilidad espectral, cálculo de distancias espectrales y desarrollo de modelos cuantitativos y cualitativos, según el caso. Por otra parte, también se ha empleado el programa informático MATLAB® (*Matrix Laboratory*, The Mathworks, Inc., USA), que consiste en un lenguaje de alto nivel y un entorno interactivo para el cálculo numérico, el análisis y visualización de datos, y la programación y desarrollo de algoritmos. Existen distintas librerías especializadas (*toolboxes*) que facilitan la utilización de distintas funciones de cálculo o de procesamiento de datos en MATLAB®. En nuestro caso, se empleó la denominada PLS Toolbox (Eigenvector Research, Mason, USA) al contener un paquete quimiométrico enfocado al tratamiento de datos espectroscópicos. Estas herramientas se utilizaron en los estudios 5.3.1, 5.3.2, 5.3.3 y 5.4.1 para la interpolación de datos espectrales, desarrollo de modelos cuantitativos y evaluación de distintos algoritmos de estandarización.

- *Bloque 2: estudios referentes al objetivo 5.*

Los colectivos de muestras utilizado en los estudios de esta tesis doctoral relacionados con este bloque se basan, principalmente, en tejido cutáneo y subcutáneo de cerdos ibéricos alimentados en montanera (Tabla 4.3.). Estas muestras han sido empleadas para la caracterización óptica de la epidermis, dermis y tejido adiposo subcutáneo de cerdo ibérico (apartados 5.6.1 y 5.6.2). Las muestras proceden de la empresa COVAP S.C.A.

Tabla 4.3. Colectivo de muestras empleados en los estudios de caracterización óptica del tejido cutáneo y subcutáneo porcino.

Publicación / Estudio	Tejido	Número de muestras	Espesor (μm)	Características
5.6.1.	adiposo	10	1.100	Congeladas hasta 24 horas previas al análisis.
		10	550	
5.6.2.	epidermis	7	550	Análisis <i>in-vitro</i> . Colocadas entre cristales con agua biológica para su análisis.
	dermis	8	1.100	

La instrumentación utilizada es un Sistema de Dobles Esferas Integradoras (DIS, *Double Integrating Spheres*), basado en un láser modulable como fuente de radiación, lo que permite enviar mayor energía dentro del sistema y obtener mejores medidas, combinado con un sistema de medida de la transmitancia dispersa (Figura 4.6). Información más detallada sobre esta técnica es expuesta en la sección 3.3.5. El diseño instrumental utilizado en estos estudios fue desarrollado por el Grupo de investigación MeBioS, liderado por el Prof. Wouter Saeys, de la University of Leuven (Bélgica) y puesto a punto por el autor de este documento para el análisis de tejidos biológicos. El sistema utilizado se encuentra descrito con detalle en el estudio 5.6.1.

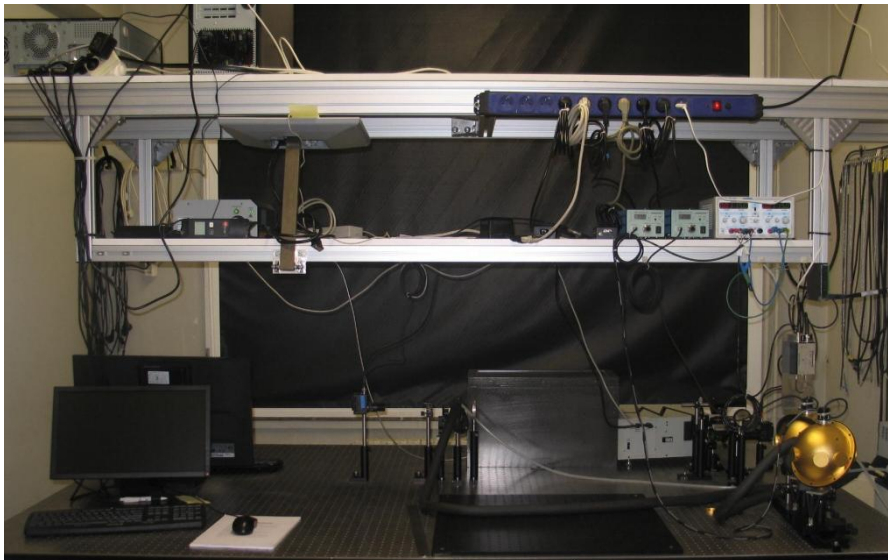


Figura 4.6. Sistema de dobles esferas integradoras combinado con un sistema de medida de la transmitancia dispersa basado en un láser modulable como fuente de radiación.

El control de dicho sistema DIS se programó en Labview (*Laboratory Virtual Instrumentation Engineering Workbench*, National Instruments, Austin, TX, USA), una plataforma y entorno de desarrollo para diseñar sistemas con un lenguaje de programación visual. En MATLAB[®], se diseñó un programa de tratamiento de la señal y automatización de los cálculos de simulación basados en el algoritmo IAD creado por Prahl (2010)¹⁶.

En cuanto al estudio 5.6.3, dado que se basa en la simulación de la propagación de la luz a través del tejido cutáneo y subcutáneo porcino, se utilizan los datos generados en los dos estudios anteriormente mencionados en este bloque (5.6.1 y 5.6.2) como valores inputs para llevar a cabo una simulación basada en Monte Carlo, mediante un algoritmo proporcionado por el Prof. Yukio Yamada de la University of Electrocommunications (Japón), durante la estancia de iniciación a la formación en este campo realizada por el autor de este trabajo. En cuanto a la parte experimental que se realiza en este estudio, se utiliza un sistema de Espectroscopía de Resolución Espacial (SRS, *Spatially Resolved Spectroscopy*), desarrollado por el grupo de investigación MeBioS de la University of Leuven (Bélgica) (Figure 4.7) y puesto a punto para el análisis de muestras de cerdo durante la estancia de formación del autor en dicha institución. Dicho sistema permite medir la señal de reflectancia a distintas distancias entre la fuente de luz y el detector, mediante un sistema de control diseñado en Labview. Una detallada descripción del mismo se realiza en el estudio 5.6.3. En cuanto al colectivo de muestras en este caso, se utilizaron 15 muestras *in-vitro* de tejido cutáneo y subcutáneo de cerdo ibérico para realizar el experimento, procedentes del matadero de COVAP S.C.A.

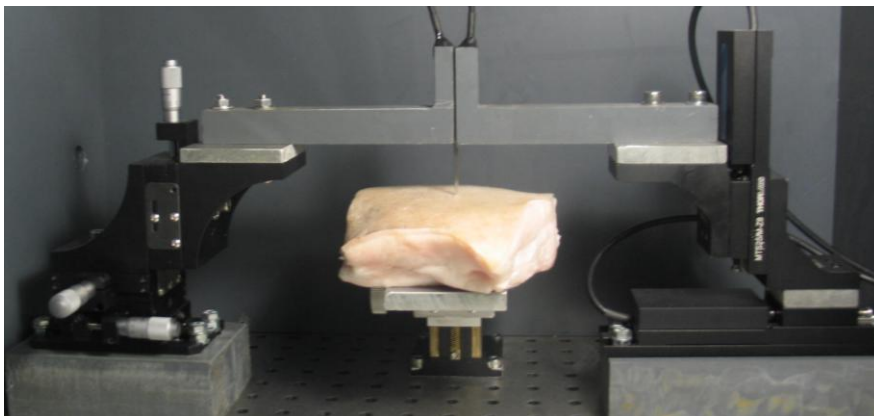


Figura 4.7. Medición de un trozo de tejido cutáneo porcino mediante espectroscopía por resolución espacial.

¹⁶ <http://omlc.ogi.edu/software/iad>

- *Bloque 3: estudio referente al objetivo 6.*

El programa MATLAB[®] (The Mathworks, USA), que permite el desarrollo y distribución de aplicaciones en forma de ejecutables sin necesidad de disponer de licencia general, ha sido utilizado para la creación de una Interfaz Gráfica de Usuario (GUI, *Graphical User Interface*) recogida en el apartado 5.5. Para ello, se ha utilizado las bases de datos de los estudios 5.3.1 y 5.3.2 y los algoritmos PLS y SIMCA de la librería PLS Toolbox (Eingenvector Research, Inc., USA) para diseñar y generar un software automatizado de análisis y predicción del perfil de ácidos grasos y clasificación según régimen alimenticio de canales de cerdos ibéricos analizados con equipos MEMS-NIRS.

Además, el sistema de apoyo a la toma de decisiones se complementó con una aplicación móvil para el sistema operativo android, desarrollada con el software AppInventor del Massachuset Institute of Technology¹⁷, para que en tiempo real se pueda registrar/consultar los datos generados en el análisis *in situ* llevados a cabo en la línea de faenado con tecnología NIRS, así como otras funciones de comunicación rápida entre usuarios.

¹⁷ <http://appinventor.mit.edu/>

ESTUDIOS Y PUBLICACIONES



5. Estudios y publicaciones

Las publicaciones que conforman la presente tesis doctoral se han publicado en revistas indexadas internacionales con los siguientes índices de calidad según Thomson Reuters Journal Citation Reports (2011):

5.1.1. Monitoring NIRS calibrations for use in routine meat analysis as part of iberian pig-breeding programs (Publicado).

Food Chemistry. ISSN: 0308-8146

Índice de impacto: 3,655 (2011) / Área: Food Science & Technology

Posición en el área: 6 de 128 revistas (1^{er} cuartil)

5.3.1. *In-situ* iberian pig carcass classification using a micro-electro-mechanical system (MEMS)-based near infrared (NIR) spectrometer (Publicado).

5.3.3. Prediction of fatty acid content in pig adipose tissues by near infrared spectroscopy: at-line versus *in-situ* analysis (Enviado).

Meat Science. ISSN: 0309-1740

Índice de impacto: 2,215 (2011) / Área: Food Science & Technology

Posición en el área: 26 de 128 revistas (1^{er} cuartil)

5.4.1. Handheld NIRS analysis for routine meat quality control: database transfer from at-line instruments (Publicado).

Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems. ISSN: 0169-7439

Índice de impacto: 1,920 (2011) / Área: Statistics & Probability

Posición en el área: 13 de 116 revistas (1^{er} cuartil)

5.5.1. Double integrating spheres measurements for estimating optical properties of pig subcutaneous adipose tissue (Enviado).

5.5.3. Characterization of diffuse reflectance near-infrared spectroscopy for non-invasive pig skin measurements (Enviado).

Food and Bioprocess Technology. ISSN: 1935-5130

Índice de impacto: 3,703 (2011) / Área: Food Science & Technology

Posición en el área: 4 de 128 revistas (1^{er} cuartil)

5.5.2. Optical properties of pig skin epidermis and dermis estimated with double integrating spheres measurements (Enviado).

Innovative Food Science and Emerging Technologies. ISSN: 1466-8564

Índice de impacto: 3,030 (2011) / Área: Food Science & Technology

Posición en el área: 12 de 128 revistas (1^{er} cuartil)

5.1. Control y actualización de modelos de calibración NIRS para productos procedentes del cerdo ibérico

Como se ha indicado en la revisión bibliográfica, una de las tareas más costosas en cuanto al análisis NIRS se refiere al mantenimiento de las ecuaciones desarrolladas en un momento dado para que sigan siendo útiles y aplicables a lo largo del tiempo a muestras futuras. Esto no es siempre fácil, ya que diversos factores pueden cambiar a lo largo del tiempo pudiendo afectar a la precisión y exactitud de los modelos NIRS.

Al inicio de esta tesis doctoral, el grupo ISPA contaba con una extensa base de datos espectrales y de referencia procedentes de varias campañas, tanto de carne picada de cerdo ibérico como de muestras intactas y fundidas de tejido adiposo subcutáneo porcino. Se detectó en ciertos casos que los modelos desarrollados en una primera etapa, al aplicarse a muestras procedentes de campañas posteriores, proporcionaban una predicción no esperada teniendo en cuenta que esas nuevas muestras, no incluidas en el colectivo de calibración, eran similares a las del colectivo que se utilizó para el desarrollo del modelo. Para resolver este problema, y dado el alto coste económico, científico y de tiempo que conllevó el desarrollo de esos modelos cuantitativos, se hace necesario la puesta a punto y evaluación de una metodología que permita hacer calibraciones NIRS suficientemente robustas, como para poder ser utilizadas con nuevas muestras y obtener datos realistas y fiables en al menos un 90 % de los casos.

Por ello, en el presente capítulo se presentan los resultados obtenidos de establecer una estrategia y metodología de control y actualización de calibraciones NIRS para carne picada (5.1.1). Dicha metodología fue, posteriormente, aplicada para el control, mantenimiento y recalibración de modelos NIRS para la predicción del contenido de ácidos grasos en muestras de grasa fundida (5.1.2) y en tejido intacto adiposo subcutáneo (5.1.3) de cerdo ibérico.



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Food Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodchem

Analytical Methods

Monitoring NIRS calibrations for use in routine meat analysis as part of Iberian pig-breeding programs

Eduardo Zamora-Rojas*, Ana Garrido-Varo, Emiliano De Pedro-Sanz, José Emilio Guerrero-Ginel, Dolores Pérez-Marín

Department of Animal Production, Faculty of Agricultural and Forestry Engineering, University of Córdoba, Campus Rabanales, N-IV, Km 396, 14014 Córdoba, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 September 2010
 Received in revised form 5 February 2011
 Accepted 30 May 2011
 Available online 2 June 2011

Keywords:

NIRS
 Robust calibration
 Quantitative analysis
 Validation
 Iberian pig
 Meat quality

ABSTRACT

The meat industry, animal breeding programmes and consumer expectations regarding meat-product labelling require fast screening techniques for the determination of meat quality. The potential of Near Infrared Spectroscopy (NIRS) for this purpose has been clearly demonstrated. This paper reports on the development, validation and updating of NIRS models for the routine analysis of ground Iberian pork muscles (*gluteus medius*, *masseter*, *longissimus dorsi* and *spinalis dorsi*). Modified Partial Least Squared (MPLS) calibration models were obtained to predict fat, moisture and protein content. The method employed was based on the use of different Mahalanobis distances for the recalibration of models, enabling the number of recalibration samples to be reduced. The final recalibrated models displayed a Standard Error of Cross-Validation (SECV) of 0.35% and a Determination Coefficient of Cross-Validation (R_{CV}^2) of 0.99 for fat; values for moisture were SECV = 0.46% and $R_{CV}^2 = 0.97$; while for protein were SECV = 0.52% and $R_{CV}^2 = 0.90$, indicating good spectral matching even for muscle types not included in the calibration.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Fresh meat is highly moisture-sensitive and varies considerably both in chemical composition and in sensory attributes. Consumers, especially in developed countries, are deeply concerned not only about the safety and the environmental impact of food products, but also about their quality in terms of health and nutritional value, and in terms of sensory properties. The implementation of rigorous control procedures are required to ensure the quality of fresh or processed meat (Prieto, Roehe, Lavín, Batten, & Andrés, 2009). Meat chemical composition and sensory attributes are strongly influenced by pre-slaughter factors (e.g. breed, sex, age, weight and environment) and also by post-mortem factors (e.g. ripening time and temperature conditions).

The measurement of major chemical constituents in fresh meat, such as fat, moisture or protein, is essential not only for labelling and consumer-acceptance purposes, but also for ensuring the right balance in dry-cured or processed products. Fat contributes to several aspects of meat quality and nutritional value (Wood et al., 2008). Moisture content is a major issue in the manufacture of processed meat products; an accurate indication of initial moisture values is essential in order to make decisions regarding ripening time and conditions (Ortiz-Somovilla, España-España,

Gaitán-Jurado, Pérez-Aparicio, & De Pedro-Sanz, 2007). The meat industry demands real-time sensors for the quality control of these parameters in fresh meat, in order to be able to improve efficiency, guarantee homogeneity, satisfy expectations and comply with current legislation.

The quality of Iberian pork products is largely determined by their fat content; a higher fat content not only slows the dehydration of dry-cured products but also enhances the sensory characteristics of dry-cured and fresh meat (Fernández et al., 2003). As defined by Bonneau and Lebret (2010), “eating quality” in pork is strongly influenced by the production system, especially in local breeds such as Iberian pigs. The interaction between factors such as genotype, age, rearing conditions and feeding regime results in different quality categories for Iberian pork products, due to their effects on the total fat content and fatty acid composition of intramuscular fat, on marbling, oiliness, brightness, aroma and flavour; these properties are noticed even by consumers (Bonneau & Lebret, 2010; Cava, Ventanas, Ruiz, Andrés, & Antequera, 2000; Ventanas, Ruiz, García, & Ventanas, 2007). An improvement in “eating quality” is normally associated with an increment in intramuscular fat (Rosenvold & Andersen, 2003).

In 1993, the Spanish Association of Iberian Pig Breeders (AECER-IBER) introduced a breeding programme based on farm records; one aim of the programme was to select breeding animals on the basis of fat quality (De Pedro et al., 2002; Fernández et al., 2003; Silió, 2000). The breeding program involves analysing the meat of the large number of animals entering the program every year

* Corresponding author. Tel./fax: +34 957 21 85 55.
 E-mail address: g32zaroe@uco.es (E. Zamora-Rojas).

(Garrido, García-Olmo, & De Pedro, 2000). The measurement of fat and protein using traditional wet-chemistry methods has proved too costly and time-consuming to be practicable.

Near Infrared Spectroscopy (NIRS) has demonstrated its ability to predict the chemical composition of raw meat and meat products. Numerous studies have reported on the successful use of NIRS for the at-line prediction of fat, moisture or/and protein content (AOAC, 2007; Prevolnik, Candek-Potokar, & Skorjanc, 2004; Prieto, Rohe et al., 2009; Tejerina, López-Parra, & García-Torres, 2009), and even for on-line analysis in the meat-processing industry (González-Martín, González-Pérez, Hernández-Méndez, Alvarez-García, & Hernández-Andaluz, 2002; Hildrum, Nilsen, Westad, & Wahlgren, 2004; Huang, Yu, Xu, & Ying, 2008; Prieto et al., 2009; Tøgersen, Isaksson, Nilsen, Bakker, & Hildrum, 1999). A number of studies have found that NIRS technology is specifically applicable to this type of analysis in Iberian pork products (González-Martín, González-Pérez, Hernández-Méndez, Alvarez-García, & Hernández-Andaluz, 2002; Martínez, Garrido-Varo, De Pedro & Sánchez, 1998; Ortiz, España, Gaitán, De Pedro, & Pérez, 2004; Ortiz-Somovilla et al., 2007; Pérez-Aparicio et al., 2004; Solís et al., 2001). Little research has been published to date on a procedure to develop robust calibrations (ASTMD6122, 2001) and less on the difficulties involved in the application of NIRS prediction models to new samples over a period of years, as required in a breeding program. Furthermore, most studies have developed calibrations without rigorous external validation for muscle-specific or homogenised, ground mixed-muscle samples.

Experience in the development and validation of NIRS calibration models for different agro-food products, and more specifically in the practical application of NIRS models for the analysis of different Iberian pork muscles as part of the Iberian pig breeding program, has shown that the development of robust calibration models, applicable over time to the large number of samples used in breeding programs, is a complex task requiring specific research. This paper reports on a method for producing, using and fine-tuning robust calibration models for the quantitative prediction of fat, moisture and protein in Iberian pork meat, applicable in long-term breeding programs.

2. Materials and methods

2.1. Sample set and NIRS analysis

A set of samples from four pork muscles (*gluteus medius*, *masseter*, *longissimus dorsi* and *spinalis dorsi*), collected over a period of several years, was used for this study (Table 1). Animals were slaughtered at an average weight of 160 kg during six different slaughter campaigns as part of the Spanish Iberian Pig Breeding Programme: 1999, 2000, 2001, 2002, 2003, 2004 and 2009. Meat was immediately vacuum-packed and stored at -20°C until analysis. Before recording NIRS spectra, muscles were ground and homogenised using a vertical cutter mixer (Heidolph DIAX 900 homogeniser).

NIRS analysis was performed using a Foss NIRSystems 6500 spectrometer (Foss-NIRSystems Inc., Silver Spring, MD, USA),

equipped with a spinning module. This instrument operates between 400–2500 nm with a 2 nm scanning interval. Ground meat samples were analysed in standard circular cups (diameter 3.75 cm). Each spectrum was the mean of 32 scans collected in reflectance mode using the WinISI software package ver 1.50 (Infrasoft International, Port Matilda, PA, USA). Two sub-samples were analysed for each sample.

2.2. Chemical analyses

Reference values for fat, moisture and protein content in 348 samples (total number of samples used for calibration and updating) were determined using ground samples and official meat and meat-product analysis methods. Samples were analysed by wet chemistry in the same year of collection and NIRS analysis. Fat content was determined following the Soxhlet procedure (ISO-R-1443). Total protein was determined by the Kjeldahl method (ISO-R-937) and moisture content was measured by oven drying to constant weight at 100°C in accordance with ISO-R-1442.

2.3. Spectral repeatability

All chemometric calculations were performed using WinISI software package ver 1.50 (Infrasoft International, Port Matilda, PA, USA). Spectrum quality was evaluated using the Root Mean Squared (RMS) statistic (Shenk & Westerhaus, 1995, 1996). This statistic indicates the similarity between different spectra of a single sample, in this case between the two spectra collected per sample. An admissible limit for spectrum quality and repeatability was determined following the procedure described by Martínez et al. (1998) to calculate the standard deviation (STD) limit from the RMS statistic and obtain an RMS cut-off value.

2.4. Population structuring and detection of spectral outliers prior to calibration development

Principal Component Analysis (PCA) was performed on a set of $N = 316$ samples (set A) in order to decompose and compress the data matrix. After PCA, the centre of the spectral population was determined in order to detect outlier samples. The Mahalanobis distance (GH) was calculated between each sample and the centre; samples with an GH value greater than 3 were considered outliers (Shenk & Westerhaus, 1996). As spectral pre-treatments, the Standard Normal Variate (SNV) plus Detrending (DT) (Barnes, Dhanoa, & Lister, 1989) procedure was used to remove the multiplicative interferences of scatter, and two derivative mathematical treatments were performed: window-wise filtering (1,10,5,1) and (2,5,5,1) where the first digit is the order of the derivative, the second is the gap over which the derivative is calculated, the third is the number of data points in a running average or smoothing and the fourth is the second smoothing (ISI, 2000).

Table 1
Sample distribution by muscle type and year of analysis.

Muscle type	Year						Total
	1999	2000	2001	2003	2004	2009	
<i>Gluteus medius</i>	27 (A)	–	–	–	–	–	27
<i>Masseter</i>	–	–	–	94 (A)	–	–	94
<i>Longissimus dorsi</i>	36 (A)	25 (A)	82 (A)	28 (A)	24 (A)	514 (B)	709
<i>Spinalis dorsi</i>	–	–	–	–	–	464 (C)	464

The letter in parenthesis indicates the set to which samples belonged.

2.5. Calibration development

Once spectral outliers had been removed (i.e. 6 samples of the original 316 were detected), a set consisting of 310 samples of three different muscles (*gluteus medius*, *masseter* and *longissimus dorsi*) was used to develop calibration models with samples from five consecutive years: 1999, 2000, 2001, 2003 and 2004 (Table 1). The set was divided into two: a training set (S^0) containing about 70% of the samples ($N = 213$) and a test set (S^1) containing the remaining 30% ($N = 97$). These samples were selected following the method proposed by Shenk and Westerhaus (1991) using the CENTER algorithm included in the WinISI software to calculate the Global Mahalanobis distance (GH). The samples were ordered based on the Mahalanobis distance to the centre of the population, and two of every three were selected to be part of the training set.

Modified Partial Least Squares (MPLS) regression, described by Shenk and Westerhaus (1995), was tested for the prediction of fat, moisture and protein in fresh Iberian pork in the 1100–2500 nm range. To prevent over-fitting, four cross-validation groups were used. Different pre-processing combinations based on derivatives and scatter correction methods were evaluated for calibration models as in the PCA analysis.

Chemical outliers were analysed using Student's T statistic, which indicates the difference between the reference and the predicted value. A critical limit of $T > 2.5$ was used to identify samples as chemical outliers (Howard & Workman, 1991).

The following statistics were used to select the best equations: Standard Error of Calibration (SEC), Standard Error of Cross-Validation (SECV), and Determination Coefficient of Cross-Validation (R_{CV}^2). The other statistic used was Residual Predictive Deviation (RPD_{CV}) (Williams & Sobering, 1996), calculated as the ratio between the standard deviation of the reference data for the training set and the Standard Error of Cross-Validation (SECV). According to Williams and Sobering (1996), a model is suitable for screening purposes – i.e. greater precision yields – if the RPD is greater than 3.

2.6. Calibration test set

The best models were subjected to evaluation using samples not involved in the calibration procedure. A test set (S^1) composed of 97 samples, not used previously in the model, was evaluated.

Models were evaluated using the Standard Error of Prediction (SEP). Validation procedure consists essentially in determining the possible existence of a significant known error, or bias, or of an unexplained error, termed the Standard Error of Prediction Corrected for bias or SEP(c) (Windham, Mertens, & Barton, 1989). Generally speaking, for calibration sets comprising 100 or more samples and validation sets composed of 9 or more samples, Shenk, Workman, and Westerhaus (2001) assume the following control limits: SEP(c) should not exceed 1.30 times the SEC and Bias should not exceed 0.6 times the SEC. The Determination Coefficient of Prediction (R_p^2), the slope of the regression line between reference data and NIRS predictions and the RPD_p values calculated from the SEP were used to evaluate the predictive ability of the models generated.

After this evaluation, training and test sets were merged in order to expand the calibration models and reflect the broadest possible sample variability.

2.7. Routine evaluation of calibration equations

A group of *longissimus dorsi* samples collected in 2009, designated set B (514 samples), was used to evaluate and recalibrate the models obtained using samples from earlier years, and a group of 464 *spinalis dorsi* samples (set C) was used to evaluate the

performance of initial and recalibrated models with samples of a muscle not included in the training set.

Other statistics evaluated, especially for these latter sets, were the Global (GH) and Neighbourhood (NH) Mahalanobis distances. GH calculates the distance between a sample and the centre of the training set; values higher than 3–4 are deemed far from the training set. NH indicates how far a sample is from the most similar samples in the training set; values higher than 0.6–1.2 denote samples with few close neighbours in the training set (Shenk & Westerhaus, 1991). The Standard Error of Difference (SED) derived from the standard deviation (SD) of differences between two predicted values was used to compare the performance – i.e. smaller is the SED, more similar are the predictions – of two calibration models for the same data set of unknown samples.

Thirty-two *longissimus dorsi* samples collected in 2009 (Table 2), and selected on the basis of GH (>3.0), NH (>1.0) and NIRS prediction values, were added to the models for recalibration purposes, since routine analysis indicated low spectrum similarity between initial training samples and the two new sets evaluated.

3. Results and discussion

3.1. Spectral repeatability

Optimisation of spectrum quality and repeatability is crucial in order to develop robust and accurate models. Martínez et al. (1998) reported that – for meat products – good sample homogenisation, aimed at avoiding the presence of lumps of fat or muscle tissue, is essential to the generation of representative libraries; statistical methods such as a defined RMS cut-off limit can be useful for this purpose. The RMS cut-off was calculated as indicated in section 2.3. The mean STD for the samples analysed was $10830 \mu\log(1/R)$, representing an RMS cut-off of $11250 \mu\log(1/R)$. Any sample whose duplicated screening scans yielded an RMS above this value was eliminated and repeated until values fell below that limit, thus ensuring a high degree of spectrum repeatability.

The RMS cut-off calculated here was similar to that obtained in other studies. Martínez et al. (1998) reported mean values of 14497 and 19992 $\mu\log(1/R)$ for homogenised samples with some probability of air pockets or tendinous tissue in the surface cup, whilst Ortiz-Somovilla et al. (2007), in a study of homogenised pork sausage, recorded a cut-off value of between 26500 and 10500 $\mu\log(1/R)$ depending on the analysis mode (up-view or down-view, respectively) of the instrument (Perten DA-7000).

The mean spectrum of the two replicates of each sample was used for further analysis.

3.2. Spectrum interpretation

All muscles displayed a similar pattern. Fat peaks were recorded at around 1200, 1720–1760 and 2310–2340 nm (Osborne, Fearn, & Hindle, 1993; Williams & Norris, 1987) and characteristic absorption bands at around 1450 and 1940 nm were water-related (Osborne et al., 1993; Williams & Norris, 1987).

3.3. Population structure and detection of spectral outliers

The 316 samples (set A) initially used to develop and validate quantitative models for the prediction of fat, moisture and protein were subjected to Principal Component Analysis (PCA). Initial examination of the data failed to disclose any strong pattern or any tendency that might be attributable to the type of muscle used. The Mahalanobis distance between each sample and the center of the population was calculated in order to detect potential spectral outliers, as described in section 2.4. GH values greater than 3 were

Table 2
Descriptive statistics for training, calibration test and recalibration sets (values expressed as % of wet weight).

Parameter	Training set (213 samples)				Calibration test set (97 samples)				Recalibration set (32 samples)			
	Min	Max	Mean	SD	Min	Max	Mean	SD	Min	Max	Mean	SD
Fat (%)	2.10	21.90	6.98	3.41	2.30	18.30	6.70	3.08	2.05	16.2	8.40	4.90
Moisture (%)	56.00	77.00	70.15	3.19	63.00	75.30	70.77	2.78	51.40	72.7	67.33	4.50
Protein (%)	16.80	26.20	21.52	1.74	16.90	24.70	21.33	1.57	18.90	24.10	22.10	1.47

Min: minimum; Max: maximum; SD: standard deviation.

found for six samples, collected in different years and from different muscles (1 *gluteus medius*, 1 *masseter* and 4 *longissimus dorsi*). Examination of the reference data showed that these samples were extreme mainly in terms of percentage fat content (greater than 21% in two, and below 4% in the other four).

These six samples were withdrawn for subsequent analysis. The identification, withdrawal and analysis of outliers constitute a major decision at this stage. Here, the high value for Mahalanobis distance indicated that samples were far away from the centre of the population. They were thus of unique importance, since spectra had been correctly collected, but the NH indicated that they had few neighbours. These samples were saved in the appropriate libraries, to be incorporated in a future expansion of the calibrations, once sufficient similar samples were available.

3.4. Calibration development

The selection of the most representative samples based on the Mahalanobis distance, as described in section 2.5, yielded a training set ($S^0 = 213$ samples) and a test set ($S^1 = 97$ samples) with similar means and standard deviations for all parameters; this indicates that spectral data *per se* are very useful for selecting well-structured training and test sets (Table 2).

The calibration models obtained using the training set (S^0) for the prediction of fat, moisture and protein did not show substantial difference between different choices of pre-processing treatments for each parameter, except that PLS factors for fat and moisture ranged from 5 to 7 depending on the mathematical treatment applied. The detection of chemical outliers using the statistic T (see section 2.5) was performed for each parameter and pre-treatment independently. The coefficients of determination of cross-validation (R^2_{cv}) were around or above 0.9 for all parameters; this value was indicative of model accuracy (Shenk & Westerhaus, 1996). The Standard Error of Cross-Validation (SECV) revealed no significant difference between pre-treatments. Fat displayed a SECV of 0.34–0.35%, moisture 0.48–0.49% and protein 0.55%. The RPD_{cv} indicated fairly adequate values for the parameters studied, except for protein content (Fig. 1). The low standard deviation (SD) and small range within the set might have influenced the low RPD_{cv} for protein, while fat and moisture models were recommendable for screening purposes.

Solís et al. (2001) obtained predictive models for fat, moisture and protein using no more than 25 ground Iberian pork samples in a feasibility study which yielded RPD_{cv} values of 9.43, 7.22 and 1.82, respectively. Barlocco, Vadell, Ballesteros, Galieta, and Cozzolino (2006), in a study of homogenised pork samples, obtained RPD_{cv} values of 2.3 for fat and 3.9 for moisture; however, as they noted, the number of samples used was very small. Both these studies used very small data sets compared to the number and variability of samples used here. González-Martín et al. (2002), in tests with ground Iberian pork meat, reported an RPD_{cv} of 7.29 for fat and 3.45 for protein, values similar to those recorded here, although protein content in their study ranged from 21% to 31%; in the present study, the range was lower (16.8–26.2%), although the maximum protein content here (26.20%) was similar

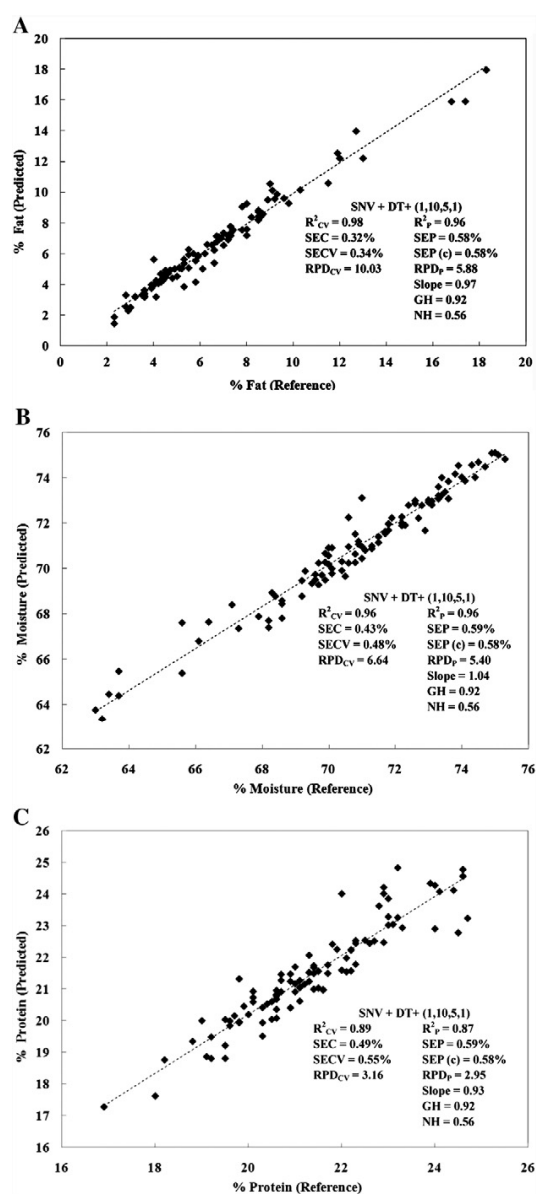


Fig. 1. Validation of the calibration models obtained using the training set ($S^0 = 213$ samples). (A) Fat content; (B) Moisture content; (C) Protein content.

to the mean content reported by these authors (26.37%). Ortiz-Somovilla et al. (2007) reported RPD_{cv} values of 8.4, 6.7 and 3.77 for fat, moisture and protein, respectively, for homogenised pork

sausage samples, whilst Gaitán-Jurado, Ortiz-Somovilla, España-España, Pérez-Aparicio, and De Pedro-Sanz (2008), in a study of dry-cured sausage, recorded values of 8.94, 6.62 and 4.74, respectively; however, their sets were artificially prepared with a mixture of muscles.

3.5. Calibration test set and final calibration

Evaluation of the models was performed using the calibration test set S^1 (97 samples). First and second derivatives were evaluated; the best models are shown in Fig. 1. Fat (Fig. 1a) yielded a SEP of 0.58%, relatively higher than the SECV. Moisture (Fig. 1b) displayed an increase of 18.64% for SEP with respect to SECV. The slope of the regression line between reference and predicted values approached a value of 1; however, the difference between reference and predicted values for this parameter might have been due to storage conditions and/or to the freezing/thawing of samples between NIRS analysis and application of the reference method. Fresh meat is highly moisture-sensitive, and moisture content is affected by all operational and storage-related factors (Cozzolino, De Mattos, & Martins, 2002). Protein (Fig. 1c) had fewer chemical outliers than the other parameters, with a low RPD_p that might be attributable to the small SD and range of the reference set. SEP(c) values were very similar to the SEP for all three parameters. Ortiz-Somovilla et al. (2007), in a study of Iberian and standard lean pork sausage mass, reported RPD_p values of 5.39, 5.48 and 2.74 for fat, moisture and protein, respectively, in minced samples, i.e. values similar to those observed here. In all the above studies, the RPD_p for protein was less than 3, indicating that the models obtained were relatively unsuitable for screening purposes.

Analysis of the Mahalanobis distance between each sample and the centre (GH) or the nearest neighbour (NH) showed that test-set samples were well represented in the population used for calibration, with average values of 0.92 for GH and 0.56 for NH. These results confirm the value of the procedure described by Shenk and Westerhaus (1991) for selecting representative training samples.

As expected, SEP increased with respect to SECV values, suggesting the need for more robust models, although the RPD_p indicated that calibrations were acceptable for fat and moisture. These results underlined the importance of using models covering the maximum variability of the product analysed, especially in the case of heterogeneous products such as meat, and also highlighted the need for more accurate models to predict chemical composition. To this end, the two groups (training and test sets) were merged, and new models were developed. Table 3 shows statistics for the calibration models developed with the full set A (310 samples = 213 samples of the training set plus 97 samples of the test set). The results obtained were very similar to those shown in Fig. 1 for a reduced number of samples. For each parameter, the number of PLS factors, R^2_{CV} and SECV lay in the same range. The new models constructed using a larger number of samples were considered valid for samples within the range of approximately 2.10–21.90% for fat, 56.00–77.70% for moisture and 16.80–26.20% for protein. The RPD_{CV} confirmed the value of these models for screening purposes.

The models yielding the most acceptable statistics were a first derivative for fat and protein prediction, and a second derivative for moisture, although there was no significant difference between data pre-treatments. Earlier models developed using the same data set had been used for genetic selection purposes in Iberian pig breeding programmes, in order to ensure the swift and accurate analysis of large numbers of animals. The models had mainly been used to predict intramuscular fat content (best parameter performance), since high percentage fat content is a key property of Iberian pork products (Fernández, Alves, Fernández, De Pedro, & López-García, 2008; Fernández, García-Casco, De Pedro, Silió & Rodríguez, 2007; Fernández et al., 2003).

3.6. Routine analysis and recalibration

Once obtained the final calibrations, they were applied to a set of 514 *longissimus dorsi* samples (set B) drawn from the breeding program (year 2009). All samples were thus completely unknown. Statistical criteria were used to determine which of the unknown samples should be sent to the wet chemistry laboratory and could be used for a future expansion of the existing training set. From an economical standpoint, it is essential to use robust statistics to identify unknown predicted samples that for any reason are still not well represented in the calibration. Here, GH and NH statistics were used for that purpose, both having demonstrated their value for spectral outlier detection (Fernández-Ahumada, Garrido-Varo, Guerrero, Pérez-Marín, & Fearn, 2008; Pérez-Marín et al., 2008; Shenk & Westerhaus, 1991). Analysis of unknown samples also used initial NIRS predicted values for fat, moisture and protein.

Only two samples had GH values above 3, while 78.59% of the 514 unknown samples had NH values above the limit (1.0), indicating little similarity to the training samples. This would suggest that the *longissimus dorsi* samples differed little, in spectral terms, from set A, due to the low number of closed samples. It should be stressed that these samples were analysed 4 years later, and therefore some changes may have occurred in the instrument, in sample preparation procedure, and/or in environmental conditions in the NIRS laboratory. There was thus a clear need for model recalibration.

To evaluate the models' performance over time and recalibrate the models, a critical step is to choose which, and how many, samples have to be sent to the laboratory for wet chemistry analysis. A robust model is usually developed to analyse all reasonable samples of a given product even from different years. These models require sample libraries that represent, spectrally and chemically, the variability of the constituents studied; moreover, it is recommended that the set covers an entire constituent range uniformly (Shenk et al., 2001). Accordingly, the GH statistic was used to detect new spectral variability, and the NH statistic – in conjunction with the initial NIR prediction for each constituent – to detect new chemically-interesting samples for analysis by wet chemistry, as well as to ensure a uniform range for each parameter in spectral libraries.

The number and type of samples to be sent for reference analysis always represents a compromise between the time and the

Table 3

Statistics for chemometric models developed for fat, moisture and protein with the full set A (310 samples) and set A+ (342 samples).

Parameter	Set	Data pre-processing	No. samples	Mean (%)	Standard deviation (%)	No. factors	SEC (%)	SECV (%)	R^2_{CV}	RPD _{CV}
Fat	A	SNV + DT (1,10,5,1)	279	6.89	3.31	7	0.33	0.36	0.98	9.19
	A+	SNV + DT (1,10,5,1)	308	7.03	3.51	6	0.34	0.35	0.99	10.02
Moisture	A	SNV + DT (2,5,5,1)	279	70.35	3.08	7	0.37	0.42	0.97	7.33
	A+	SNV + DT (1,10,5,1)	308	70.07	3.35	7	0.44	0.46	0.97	7.28
Protein	A	SNV + DT (1,10,5,1)	296	21.46	1.68	6	0.47	0.50	0.91	3.36
	A+	SNV + DT (1,10,5,1)	322	21.52	1.68	7	0.49	0.52	0.90	3.23

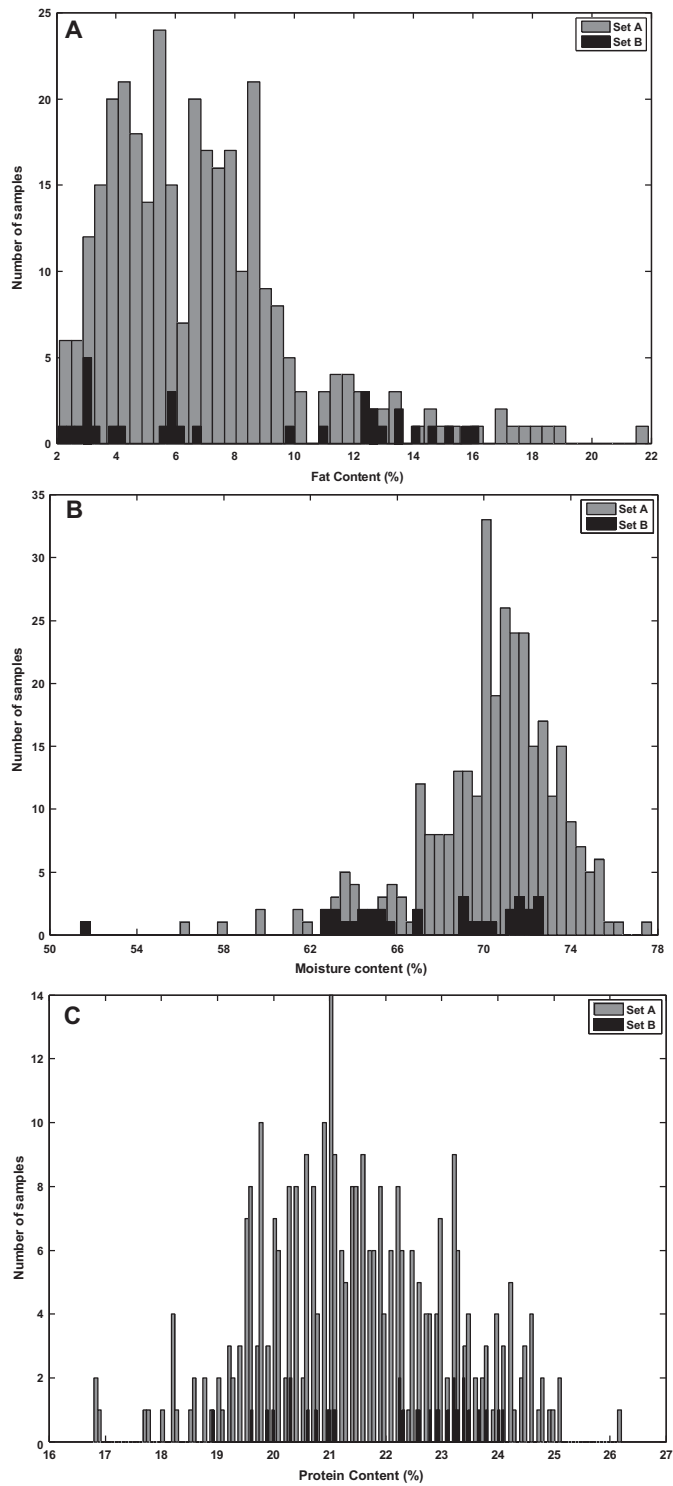


Fig. 2. Sample distribution (set A) for each parameter in terms of reference data. (A) Fat content; (B) Moisture content; (C) Protein content. (Set B refers to the 32 recalibration samples).

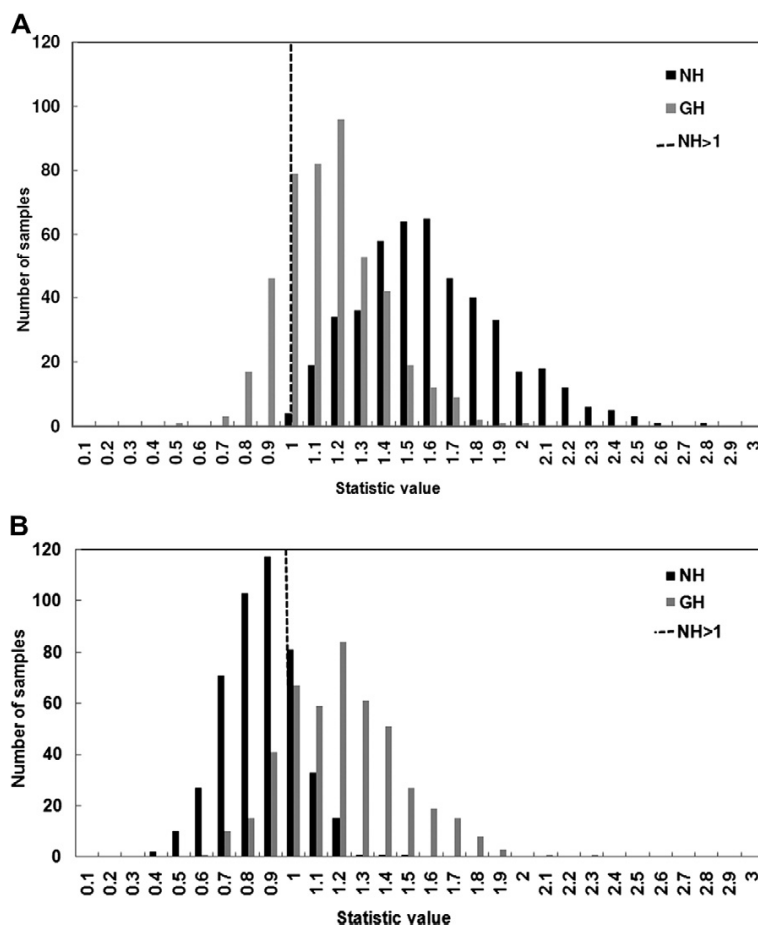


Fig. 3. Frequency histogram of GH and NH values of set C predicted (A) with initial models (Table 3; set A) and (B) with recalibrated models (Table 3; set A+).

money available for analysis. Here, in the light of the experience acquired in developing robust calibrations, a set of 32 samples was selected from group B (Table 2), comprising samples deemed spectral outliers, with high GH (2 samples), and samples with both a high NH (>1.0) and a prediction value for one or more parameters that was not well represented in the models (30 samples).

The range, mean and standard deviation of a training set provide an overview of the structure of the samples used in the model; however, they provide no information on sample distribution or, therefore, on possible gaps in reference values in the training set. Sample distribution (set A) for each parameter in terms of reference data is shown in Fig. 2. Most training set samples had a percentage fat content in the range 4–9%; it might therefore be useful to include samples with a fat content >10% (Fig. 2a). Moisture content for most samples lay in the range 70–74%, so there was clearly a need for more training samples above or below that range (Fig. 2b). The small range recorded for protein content enabled ready identification of more gaps in the training set; in general terms, however, the incorporation of samples containing less than 19% and more than 23.85% protein was deemed particularly useful (Fig. 2c). Results for the 32 samples referred for wet chemistry analysis with NH > 1 or extreme NIR prediction values showed that these really were extreme samples, or were located in intervals not well-covered in the training set (Fig. 2a–c). This highlighted the ability of the Neighbour distance (NH) statistic to confirm – on

the basis of spectral information alone – that existing models were not enough suitable for the prediction of those unknown samples.

Models recalibrated by including the 32 *longissimus dorsi* samples from 2009 are shown in Table 3 (set A+). The procedure used to obtain and evaluate these models was as described earlier. The new training set of 348 samples (set A+ = 316 samples of set A plus 32 samples from set B) was subjected to PCA to detect spectral outliers. The same 6 samples displaying GH > 3 as in the first PCA analysis were removed. The statistics indicated a degree of accuracy, in terms of cross-validation errors, similar to those of the previous models; however, more samples were included with a view to ensuring a balanced distribution over the whole potential range for each parameter. The RPD_{CV} for the recalibrated models (Table 3; set A+) showed an improvement in the goodness of fat prediction models, and similar values for moisture and protein content to those obtained using non-recalibrated models (Table 3; set A).

Equations for fat and moisture accounted for over 99% and 97%, respectively, of the variation existing (Table 3; set A+). The protein equation, however, accounted for only 90% of variability. This may be attributable to the SEL/SD ratio. According to the formula provided by Howard and Workman (1991), the maximum determination coefficient (R^2) can be estimated as:

$$R_{\max}^2 = 1 - (\text{SEL}/\text{SD})^2$$

where SEL is the standard error of laboratory and SD the standard deviation of the training set for the parameter studied. Here, the maximum R^2 estimation for protein was 0.93, since the standard error of laboratory (SEL) was 0.46 (data not shown), while SD was 1.74, a low value compared to the other parameters tested. The small SD and range in the calibration sets for protein content compared to fat and/or moisture content may have been responsible for the lower accuracy and poorer prediction ability of the protein model.

The standard error of difference (SED) within the predictions for set B (minus the 32 samples included in the training set) obtained using the initial models developed with set A (Table 3; set A) versus the recalibrated models (Table 3; set A+) were: 0.15% for fat; 0.11% for moisture and 0.28% for protein. The recalibrated models showed an improvement in GH and NH statistics when set B (minus the 32 samples included in the training set) was evaluated: the initial models yielded an average GH = 1.60 and NH = 1.21, while the recalibrated models yielded an average GH = 0.75 and NH = 0.41. Comparison of GH and NH distribution for the two initial models and for the recalibrated models showed that only 0.2% of samples had NH values above the established limit. Thus, predicted values were more reliable using the recalibrated models, which enabled the detection of real spectral or chemical outliers. This was a very positive finding, given the time and cost involved in analysing meat samples by traditional wet chemistry.

Set C (464 *spinalis dorsi* samples, 2009) was used to compare the performance of the best initial models developed with set A and the best recalibrated models (set A+) for each parameter, using samples of a muscle type not previously included in the training set. The SEDs in both cases were: 0.12%; 0.07% and 0.09% for fat, moisture and protein content, respectively. Thus, there was no notable difference in prediction values between the recalibrated models and the initial models. However, the GH and NH statistics provide information on certain differences between the two models. In both cases, all *spinalis dorsi* samples had GH values below 3 (Fig. 3). The final (recalibrated) models yielded higher average GH (1.16) and NH (0.81) values for *spinalis dorsi* samples than for *longissimus dorsi* (set B) samples. This might be due to the absence of specific samples of this muscle type in the training set. Even so, common characteristics and the effect of grinding enabled a good spectral match with the training population. Comparison of initial and recalibrated models for the prediction of *spinalis dorsi* samples (Fig. 3a and b, respectively), showed a reduction in individual GH and NH values for set C, suggesting that NIR spectra may have been influenced by the timing of analyses (or instrument status, or operator-related differences); this would indicate that the inclusion of new, current samples in routine analysis can help to detect outliers or the poor performance of models obtained at an earlier stage. Average NH values for the *spinalis dorsi* samples exceeded the limit for this statistic, probably due to spectral differences between muscle types, since this muscle was not included in the training set. When predictions were performed using the recalibrated models, GH values for set C displayed a general fall, while for 88.8% of samples NH values dropped below the 1.0 limit (Fig. 3b). Therefore, the inclusion of new samples in routine models can help to adjust models to new instrument, operator, and/or room conditions (changes that can occur even when the same sample preparation protocols are followed), making efficient use of the information provided by the statistics GH and NH.

4. Conclusions

The results support the general view that NIRS is suitable for the evaluation of meat chemical composition, and offers a promising method for classifying individual animals in breeding programmes on the basis of intramuscular fat content.

Most published papers in this field have used between 30–150 samples for calibration purposes and a reduced number of samples for external validation. Here, use of a large data set with a wide range of reference values, as well as over 90 test samples for initial accurate evaluation, ensure the realistic robustness of the calibration models.

A suitable calibration model for routine analysis requires good spectral libraries, a reliable validation process, and regular testing of real performance. The use and understanding of spectral and chemical distance statistics to ensure the reliability/suitability of the NIRS predicted values is critical in meat routine analysis. The statistics GH and NH can be used to interpret the prediction results for new samples in routine analysis. The method outlined here can be used to fine-tune or recalibrate a model, using a small number of new unknown samples, and ensures reliable evaluation as well as the detection of really extreme samples.

Acknowledgements

This work was financed by Research Project INIA “FIT 2006-060000”, Research Excellence Program of the Andalusian Regional Government (Project n° P09-AGR-5129) and co-financed by ERDF funds (1FD1997-1252-CO-02 and 1FD1997-0990). The authors are grateful to the Iberian pig producers AECERIBER, COVAP and SAT Vallehermoso for providing the experimental materials. Thanks are also given to technical staff of the Animal Production Department. EZR acknowledges the financial support of the Spanish Ministry of Education as a fellow of the Program “Training of University Teachers” (Formación del Profesorado Universitario, FPU. AP2008-00838).

References

- AOAC. (2007). Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists (18th ed.), Gaithersburg, MD: Method 2007.04.
- ASTMD6122. (2001). Guidelines for the development and validation of near infrared (NIR) spectroscopic methods. Association of Analytical Chemist with the Research Based on Pharmaceutical Industry.
- Barlocco, N., Vadell, A., Ballesteros, F., Galiotta, G., & Cozzolino, D. (2006). Predicting intramuscular fat, moisture and Warner-Bratzler shear force in pork muscle using near infrared reflectance spectroscopy. *Animal Science*, 82, 111–116.
- Barnes, R. J., Dhanoa, M. S., & Lister, S. J. (1989). Standard normal variate transformation and detrending of near infrared diffuse reflectance spectra. *Applied Spectroscopy*, 43, 772–777.
- Bonneau, M., & Lebret, B. (2010). Production systems and influence on eating quality of pork. *Meat Science*, 84, 293–300.
- Cava, R., Ventanas, J., Ruiz, J., Andrés, A. I., & Antequera, T. (2000). Sensory characteristics of Iberian ham: influence of rearing system and muscle location. *Food Science Technology International*, 6, 235–242.
- Cozzolino, D., De Mattos, V., & Martins, V. (2002). Visible/near infrared spectroscopy for predicting composition and tracing system of production of beef muscle. *Animal Science*, 74, 477–484.
- De Pedro, E. J., Rodríguez, C., Núñez, N., Garrido, A., García-Olmo, J., Dieguez, E., et al. (2002). Obtención de medidas de calidad de carne y grasa en el esquema de evaluación genética de cerdos Ibéricos mediante NIRS. *Solo Cerdo Ibérico*, 8, 7–16.
- Fernández, A. I., Alves, E., Fernández, A., De Pedro, E., & López-García, M. (2008). Mitochondrial genome polymorphisms associated with *longissimus* muscle composition in Iberian pigs. *Journal of Animal Science*, 86, 1283–1290.
- Fernández, A., De Pedro, E., Núñez, N., Silió, L., García-Casco, J., & Rodríguez, C. (2003). Genetic parameters for meat and fat quality and carcass composition traits in Iberian pigs. *Meat Science*, 64, 405–410.
- Fernández, A., García-Casco, J., De Pedro, E., Silió, L., & Rodríguez, M.C. (2007). Genetic antagonism between intramuscular fat content and primal cuts in Iberian pigs? In A. Audiot, F. Casablanca, G. Monin (Eds.). “5th International Symposium of the Mediterranean Pig”. *Options Méditerranéennes*. Ser A. Séminaires Méditerranéennes. No 76. (pp. 43–46) CIHEAM, INRA, SEAE.
- Fernández-Ahumada, E., Garrido-Varo, A., Guerrero, J. E., Pérez-Marín, D., & Fearn, T. (2008). Taking NIR calibrations of feed compounds from the laboratory to the process: calibration transfer between pre-dispersive and post-dispersive instruments. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 56, 10135–10141.
- Gaitán-Jurado, A. J., Ortiz-Somovilla, V., España-España, F., Pérez-Aparicio, J., & De Pedro-Sanz, E. (2008). Quantitative analysis of pork dry-cured sausages to quality control by NIR spectroscopy. *Meat Science*, 78, 391–399.
- Garrido, A., García-Olmo, J., & De Pedro, E. J. (2000). Espectroscopia de Infrarrojo Cercano (NIRS). Una metodología para implementar en sistemas de

- aseguramiento de la calidad y trazabilidad de productos derivados del cerdo ibérico. *Solo Cerdo Ibérico*, 4, 93–102.
- González-Martín, I., González-Pérez, C., Hernández-Méndez, J., Álvarez-García, N., & Hernández-Andaluz, J. L. (2002). On-line non-destructive determination of proteins and infiltration fat in Iberian pork loin by near infrared spectrometry with a remote reflectance fiber optic probe. *Analytica Chimica Acta*, 453, 281–288.
- Hildrum, K. I., Nilsen, B. N., Westad, F., & Wahlgren, N. M. (2004). In line analysis of ground beef using a diode array near infrared instrument on a conveyor belt. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 12, 367–376.
- Howard, M., & Workman, Y. (1991). *Statistics in Spectroscopy*. Inc. NY: Academic Press.
- Huang, H., Yu, H., Xu, H., & Ying, Y. (2008). Near Infrared spectroscopy for on/in-line monitoring of quality in foods and beverages: a review. *Journal of Food Engineering*, 87, 303–313.
- ISI (2000). *The complete software solution using a single screen for routine analysis, robust calibrations and networking*. USA: Infrasoft International Sylver Spring MD.
- Martínez, M. L., Garrido, A., De Pedro, E. J., & Sánchez, L. (1998). Effect of sample heterogeneity on NIR meat analysis: The use of the RMS statistic. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 6, 313–320.
- Ortiz, V., España, F., Gaitán, A. J., De Pedro, E., & Pérez, J. (2004). Pork meat mixes characterization through near infrared spectroscopy. Freezing/thawing effect on the models. In A.M.C. Davies & A. Garrido-Varo (Eds.), *Near Spectroscopy: Proceedings of the 11th International Conference* (pp. 523–528). NIR Publications, 6 Charlton Mill, Charlton, Chichester, West Sussex, UK.
- Ortiz-Somovilla, V., España-España, F., Gaitán-Jurado, A. J., Pérez-Aparicio, J., & De Pedro-Sanz, E. J. (2007). Proximate analysis of homogenized and minced mass of pork sausages by NIRS. *Food Chemistry*, 101, 1031–1040.
- Osborne, B. G., Fearn, T., & Hindle, P. H. (1993). Practical NIR spectroscopy with applications. In B. G. Osborne, T. Fearn, & P. H. Hindle (Eds.), *Food and Beverage Analysis* (pp. 11–35). Essex: Longman.
- Pérez-Aparicio, J., De Pedro-Sanz, E., García-Olmo, J., González-Rodríguez, A., Miranda-Losa, A. C., & España-España, F. (2004). Utilization of NIR to predict the fat percentage on commercial sliced “salchichón”. In A. M. C. Davies & A. Garrido-Varo (Eds.), *Near Spectroscopy: Proceedings of the 11th International Conference* (pp. 523–528). NIR Publications, 6 Charlton Mill, Chichester, West Sussex, UK: Charlton.
- Pérez-Marín, D. C., Garrido-Varo, A., Guerrero, J. E., Gómez, A., Soldado, A., & De La Roza, B. (2008). External validation and transferability of NIRS models developed for detecting and quantifying MBM in intact compound feedingstuffs. *Journal of Food Quality*, 31(1), 96–107.
- Prevolnik, M., Candek-Potokar, M., & Skorjanc, D. (2004). Ability of NIR spectroscopy to predict meat chemical composition and quality – a review. *Czech Journal of Animal Science*, 49(11), 500–510.
- Prieto, N., Roehle, R., Lavín, P., Batten, G., & Andrés, S. (2009). Application of near infrared reflectance spectroscopy to predict meat and meat products quality: A review. *Meat Science*, 83, 175–186.
- Prieto, N., Ross, D. W., Navajas, E. A., Nute, G. R., Richardson, R. I., Hyslop, J. J., et al. (2009). On-line application of visible and near infrared reflectance spectroscopy to predict chemical-physical and sensory characteristics of beef quality. *Meat Science*, 83, 96–103.
- Rosenvold, K., & Andersen, H. J. (2003). Factors of significance for pork quality: A review. *Meat Science*, 64, 219–237.
- Shenk, J. S., & Westerhaus, M. O. (1991). Population structuring of near infrared spectra and modified partial least squares regression. *Crop Science*, 31, 1548–1555.
- Shenk, J. S., & Westerhaus, M. O. (1995). *Analysis of agriculture and food products by near infrared reflectance spectroscopy*. NIRSystems: Monograph.
- Shenk, J. S., & Westerhaus, M. O. (1996). Calibration the ISI way. In A. M. C. Davies & P. C. Williams (Eds.), *Near infrared spectroscopy: The future waves* (pp. 198–202). Chichester, UK: NIR Publications.
- Shenk, J. S., Workman, J. J., & Westerhaus, M. O. (2001). Application of NIR spectroscopy to agricultural products. In D. A. Bruns & E. W. Ciurczak (Eds.), *Handbook of near-infrared analysis* (pp. 419–474). New York, Basel: Marcel Dekker.
- Silió, L. (2000). Iberian pig breeding programme. In S. Galal, J. Boyazoglu, & K. Hammond (Eds.), *Developing breeding strategies for lower input animal production environments* (pp. 511–519). Rome: ICAR.
- Solís, M., De Pedro, E., Garrido, A., García, J., Silió, L., Rodríguez, C., et al. (2001). Evaluación de la composición del lomo de cerdo ibérico mediante la tecnología NIRS. *ITEA*, 22(2), 613–615.
- Tejerina, D., López-Parra, M. M., & García-Torres, S. (2009). Potential used of near infrared reflectance spectroscopy to predict meat physico-chemical composition of guinea fowl (*Numida meleagris*) reared under different production systems. *Food Chemistry*, 113, 1290–1296.
- Williams, P. C., & Norris, K. H. (Eds.). (1987). *Near-infrared technology in the agricultural and food industries*. St. Paul, MN: American Association of Cereal Chemists.
- Tøgersen, G., Isaksson, T., Nilsen, B. N., Bakker, E. A., & Hildrum, K. I. (1999). On-line NIR analysis of fat, water and protein in industrial scale ground meat batches. *Meat Science*, 51, 97–102.
- Ventanas, S., Ruiz, J., García, C., & Ventanas, J. (2007). Preference and juiciness of Iberian dry-cured loin as affected by intramuscular fat content, crossbreeding and rearing systems. *Meat Science*, 77, 324–330.
- Williams, P. C., & Sobering, D. (1996). How do we do it: A brief summary of the methods we use in developing near infrared calibrations. In A. M. C. Davies & P. C. Williams (Eds.), *Near Infrared Spectroscopy: The Future Waves*. Chichester, UK: NIR Publications, pp. 185–188.
- Windham, W.R., Mertens, D.R., & Barton, F.E. (1989). Protocol for NIRS calibration: sample selection and equation development and validation. In: G.C. Martens, J.S. Shenk & F.E. Barton II (Eds.). *Near Infrared Spectroscopy (NIRS): Analysis of Forage Quality, Agriculture Handbook* (Vol. 643, pp. 96–103) USDA-ARS: US Government Printing Office, Washington.
- Wood, J. D., Enser, M., Fisher, A. V., Nute, G. R., Sheard, P. R., Richardson, R. I., et al. (2008). Fat deposition, fatty acid composition and meat quality: a review. *Meat Science*, 78, 343–358.

5.1.2. Control y recalibración de modelos NIRS para la predicción de ácidos grasos en muestras de grasa subcutánea fundida de cerdo ibérico

Introducción

El análisis cuantitativo de grasa fundida para la predicción del perfil de ácidos grasos, sobre todo de los cuatro ácidos grasos principales (palmítico, esteárico, oleico y linoleico), ha sido demostrado en múltiples estudios (ver apartado 3.3.4). El análisis de rutina de grasa fundida por transflectancia necesita de estrategias quimiométricas para la corrección de factores conocidos, como el desgaste de la lámina de oro que actúa como superficie reflectante, y no conocidos (Pérez-Marín et al., 2007a, 2010a). Sin embargo, se ha observado que en el análisis de rutina de grasas fundidas pueden aparecer desviaciones en los estadísticos que informan sobre la similitud espectral de las nuevas muestras a predecir en relación al colectivo de calibración. Por eso, en este estudio se plantea una metodología de supervisión, control y recalibración de modelos NIRS cuantitativos para el análisis del perfil de ácidos grasos de grasa fundida basada en el empleo conjunto de estrategias quimiométricas, como el fichero de repetibilidad, junto con el procedimiento propuesto por Zamora-Rojas et al. (2011) (apartado 5.1.1), fundamentado en los estadísticos de distancia de Mahalanobis global (GH) y de vecinos (NH), más las predicciones iniciales de los modelos NIRS a recalibrar.

Material y métodos

Un total de 922 muestras de grasa fundida de cerdo ibérico recogidas durante varios años (Tabla 5.1.2.1) fueron analizadas en modo transflectancia en un equipo Foss NIRSystems 6500 (FNS, Foss NIRSystems Inc., Sylver Spring, MD, USA). Dicho equipo consta de un módulo giratorio que trabaja en el rango espectral de 400-2.500 nm con una resolución espectral de 2 nm. El análisis se realizó en las mismas fechas en las que se recogieron las muestras. Dichas muestras de grasa fueron fundidas en un microondas siguiendo el protocolo de De Pedro et al. (1997) y congeladas hasta 24 horas antes del análisis. Las muestras se analizaron en cápsulas de transflectancia, con un diámetro de 3,5 cm y un paso óptico de 0,1 mm, por duplicado.

Tabla 5.1.2.1. Número de muestras de grasa fundidas analizadas en FNS por año.

	2000	2003	2004	2005	2007	2009	2010
Número de muestras	188	74	434	24	92	38	72

El software WinISITM (ver 1.50, Infracsoft International Port Matilda, PA, USA) se utilizó para el análisis quimiométrico de los datos. En este programa

se calculó, el estadístico RMS (*Root Mean Squared*) para evaluar la repetibilidad espectral. Aquellos espectros con una variabilidad superior al límite establecido fueron eliminados y repetidos. El límite utilizado fue el propuesto por García-Olmo (2002) de $4.000 \mu\log(1/R)$ para grasa fundida de cerdo ibérico analizada en modo de transreflectancia. Posteriormente, se calculó el espectro medio para el resto de operaciones.

Se utilizó un Análisis de Componentes Principales (PCA) para el cálculo de la distancia Global de Mahalanobis (GH). Las muestras cuyos valores para este parámetro fueron superiores a 3 se seleccionaron como anómalas espectrales (Shenk y Westerhaus, 1996). Se han evaluado distintos pretratamientos de la señal espectral: SNV + DT (Barnes et al., 1989) combinado con distintas derivadas: (1,5,5,1), (1,10,5,1), (2,5,5,1) y (2,10,5,1), donde el primer dígito se refiere al orden de la derivada, el segundo a la ventana en la cual la derivada es aplicada, el tercero al número de variables utilizadas por suavizado y el cuarto al segundo suavizado (ISI, 2000).

Como muestra representativa (*check fat*) para la creación del fichero de repetibilidad (algoritmo matemático que resta la media del colectivo en incluido en dicho fichero a cada una de las muestra de calibración, asignándole valores nulos a los constituyentes. Luego, desarrolla un modelo PLS (Westerhaus et al., 1990)) se utilizó una muestra con una composición en los cuatro ácidos grasos principales similar a la media del colectivo de calibración. Pérez-Marín et al. (2007a) describen el uso de este algoritmo para el desarrollo de modelos cuantitativos NIRS en grasa fundida de cerdo ibérico. Esa misma metodología es utilizada en este estudio. Debido al largo periodo evaluado (10 años), fueron necesarias varias muestras de grasa control (8 muestras). El análisis de estas muestras control se realizó con una frecuencia quincenal por duplicado, incluso en los periodos donde no hubo análisis rutinario de grasa animal.

Los modelos de calibración fueron desarrollados con el algoritmo de Regresión por Mínimos Cuadrados Parciales Modificado (M-PLS), desarrollado por Shenk y Westerhaus (1991c). La selección del número de componentes principales para desarrollar los modelos se basó en los resultados obtenidos por validación cruzada utilizando 4 grupos de validación. El estadístico *t* de Student se utilizó para la detección de anómalos químicos. Este estadístico calcula la diferencia entre el valor de referencia y el valor predicho para una muestra. Un valor de *t* mayor de 2,5 se suele utilizar como límite para considerar una muestra como anómalo químico (Howard y Workman, 2003).

En una primera etapa de estudio, el colectivo de calibración estuvo compuesto por las muestras analizadas hasta el año 2007, dejando para validación externa las muestras del año 2010. Esto intenta simular una posible situación real que se puede dar en el análisis de rutina, donde existe una ecuación desarrollada en una primera fase, que se aplica a nuevas muestras de

años posteriores. Una vez evaluados estos modelos, se procedió a utilizar la metodología propuesta por Zamora-Rojas et al. (2011) para seleccionar muestras representativas recomendables a incluir en la calibración. Dado que dicha metodología se detalla en la sección anterior, no se repite en este estudio. Siguiendo el mismo criterio, los estadísticos utilizados en Zamora-Rojas et al. (2011) son los que se han considerado en este estudio para evaluar los modelos cuantitativos.

Resultados y discusión

El colectivo de calibración inicial para el desarrollo de los modelos predictivos de la composición de los cuatro ácidos grasos principales en grasa fundida de cerdo ibérico se constituyó con las muestras de los años 2000, 2003, 2004, 2005 y 2007. En esta etapa de modelado, se creó un fichero de repetibilidad para controlar los factores variables e incontrolables que afectan al análisis de transflectancia de este tipo de muestras. En dicho fichero se incluyeron espectros de grasa control de todo el periodo hasta la fecha en la que fueron analizadas las muestras de validación (2010). Es decir, aunque el fichero de calibración tuviera muestras hasta 2007, el fichero de repetibilidad corrige dichos modelos hasta 2010. La Tabla 5.1.2.2 muestra los estadísticos referentes a los colectivos de calibración (796 muestras de los años 2000 hasta 2007) y del colectivo de validación (110 muestras de los años 2009 y 2010), tras haberse eliminado los anómalos espectrales.

Tabla 5.1.2.2. Estadísticos descriptivos de las características del colectivo de calibración y validación.

Parámetro	Colectivo de calibración (796 muestras)				Colectivo de validación (120 muestras)			
	Media (%)	Min. (%)	Max. (%)	D.S. (%)	Media (%)	Min. (%)	Max. (%)	D.S. (%)
Palmítico (C16:0)	20,93	15,2	26,4	2,0	21,66	15,9	27,1	2,35
Esteárico (C18:0)	9,77	5,4	16,5	1,61	10,43	7,0	17,0	2,06
Oleico (C18:1)	53,59	45,0	60,3	3,16	52,8	43,1	59,2	3,71
Linoleico (C18:2)	9,08	6,0	14,0	1,04	8,61	6,2	12,0	1,28

Min.: mínimo; Max.: máximo; D.S.: desviación estándar.

La Tabla 5.1.2.3 muestra los mejores modelos para la predicción de la composición de los cuatro ácidos grasos principales en grasa fundida de cerdo ibérico. Estos estadísticos hacen referencia al colectivo de calibración una vez eliminados los anómalos químicos.

Aunque los valores de RPD_{cv} indican que los modelos pueden ser utilizados en análisis analíticos de rutina al presentar valores mayores de 3, los valores SEPs (predichos con las 110 muestras de 2009-2010) muestran una desviación, de aproximadamente el doble, con respecto a los valores SECVs. Estos resultados señalan que, aunque se haya intentado corregir algunas desviaciones mediante el fichero de repetibilidad, todavía hay factores que

afectan a la robustez de esos modelos de rutina cuando son aplicados a muestras analizadas en años posteriores al de desarrollo de la ecuación. De hecho, los valores de RPD_p son bastante inferiores a los de validación cruzada, aunque están por encima del límite de 3, excepto para el ácido esteárico, que establece Williams y Sobering (1996) para considerar una ecuación como adecuada para el análisis de rutina. Los valores de GH y NH indican claramente que las nuevas muestras predichas no son espectralmente muy similares a las del colectivo de calibración al superar los límites establecidos en la literatura por Shenk y Westerhaus (1991b). De hecho, un análisis de la distribución de la composición de cada ácido graso del colectivo de calibración (muestras 2000-2007) indicó que existía una descompensación en cuanto a muestras con bajo contenido en oleico (es decir, de la categoría “cebo”). Este hecho indica que, además de que sean interesantes para recalibrar considerar aquellas con valores GH y NH altos, incluir muestras con un bajo contenido en oleico que equilibraran la distribución de este parámetro en el colectivo de calibración sería recomendable.

Ante estos resultados, la metodología expuesta por Zamora-Rojas et al. (2011) se utilizó para seleccionar 20 muestras representativas del periodo 2009-2010. Tras incluir estas muestras en el colectivo de calibración (816 muestras), se desarrollaron nuevamente los modelos de calibración actualizados. Estos modelos fueron, entonces, evaluados con las 90 muestras restantes de los años 2009 y 2010. En la Tabla 5.1.2.4 se detallan los estadísticos descriptivos de los nuevos colectivos de calibración y validación. La Tabla 5.1.2.5 expone los mejores modelos desarrollados para el análisis cuantitativo de los cuatro ácidos grasos principales en cerdo ibérico tras la eliminación de los nuevos anómalos químicos.

Tabla 5.1.2.3. Modelos de calibración para la predicción cuantitativa del perfil de ácidos grasos de muestras de grasa fundida.

Parámetro	N	Media (%)	Min. (%)	Max. (%)	D.S. (%)	No. PLS	SEC (%)	SECV (%)	R ²	RPD _{cv}	SEP (%)	RPD _p	GH	NH
Palmítico (C16:0)	765	20,95	17,2	26,4	1,97	15	0,32	0,33	0,97	5,97	0,63	3,13	3,57	1,35
Esteárico (C18:0)	779	9,75	5,9	14,9	1,56	9	0,44	0,45	0,92	3,46	0,93	1,67	3,57	1,35
Oleico (C18:1)	754	53,67	45,0	60,3	3,13	16	0,32	0,32	0,99	10,09	0,94	3,33	3,57	1,35
Linoleico (C18:2)	758	9,09	6,0	14,0	1,02	16	0,17	0,18	0,97	5,80	0,33	3,09	3,57	1,35

N.: número de muestras; Min.: mínimo; Max.: máximo; D.S.: desviación estándar; Rango de longitudes de onda: 1.100-2.500 nm; Intervalo entre longitudes de onda: 2 nm. Pretratamiento: SNV+DT y segunda derivada (2,5,5,1).

Tabla 5.1.2.4. Estadísticos descriptivos de las características del colectivo de calibración y validación una vez seleccionadas las 20 muestras para recalibración.

Parámetro	Colectivo de calibración (816 muestras)				Colectivo de validación (90 muestras)			
	Media (%)	Min. (%)	Max. (%)	D.S. (%)	Media (%)	Min. (%)	Max. (%)	D.S. (%)
Palmítico (C16:0)	20,96	15,2	26,4	2,03	21,5	17,3	27,1	2,24
Esteárico (C18:0)	9,8	5,4	17,0	1,65	10,28	7,0	14,9	1,94
Oleico (C18:1)	53,52	43,1	60,3	3,20	53,25	44,0	59,1	3,58
Linoleico (C18:2)	9,08	6,0	14,0	1,06	8,53	6,6	10,9	1,12

N.: número de muestras; Min.: mínimo; Max.: máximo D.S.: desviación estándar.

Tabla 5.1.2.5. Modelos de calibración actualizados para la predicción cuantitativa del perfil de ácidos grasos de muestras de grasa fundida.

Parámetro	N	Media (%)	Min. (%)	Max. (%)	D.S. (%)	No. PLS	SEC (%)	SECV (%)	R ²	RPD _{cv}	SEP (%)	RPD _p	GH	NH
Palmítico (C16:0)	784	20,98	17,2	26,4	1,98	15	0,33	0,33	0,97	6,0	0,54	3.66	1,59	0,26
Esteárico (C18:0)	796	9,76	5,9	14,9	1,56	9	0,45	0,45	0,92	3,46	0,59	2.64	1,59	0,26
Oleico (C18:1)	777	53,62	45,0	60,3	3,12	16	0,33	0,33	0,99	9,75	0,54	5.76	1,59	0,26
Linoleico (C18:2)	776	9,09	6,0	14,0	1,04	16	0,18	0,18	0,97	5,77	0,34	3,05	1,59	0,26

N.: número de muestras; Min.: mínimo; Max.: máximo; D.S.: desviación estándar; Rango de longitudes de onda: 1.100-2.500 nm; Intervalo entre longitudes de onda: 2 nm. Pretratamiento: SNV+DT y segunda derivada (2,5,5,1).

Los valores SEPs, excepto para el linoleico, de la Tabla 5.1.2.5 son inferiores a los de la Tabla 5.1.2.3. Como consecuencia, los valores de RPD_p muestran un incremento de sus valores al comparar ambas tablas, indicando la idoneidad de este análisis para estimar la composición de los cuatro ácidos grasos en grasa de cerdo ibérico. Esto se debe, en primer lugar, al hecho de que al incluir muestras extremas en el colectivo de calibración, tanto los errores de predicción como los valores de GH y NH se vean reducidos. Sin embargo, también es cierto que la recalibración de los modelos, con un número reducido de muestras seleccionadas mediante la metodología presentada en esta sección, ha equilibrado la distribución de los valores de cada parámetro en el colectivo de calibración, por lo que los modelos serán más robustos.

Los errores de predicción obtenidos en este estudio bien es cierto que son superiores a otros encontrados en la literatura, al igual que los valores RPD son inferiores (la mayoría de los valores RPD en la literatura se refieren a validación cruzada con valores de: 4,83-8,05 (C16:0), 4,75-6,08 (C18:0), 8,67-16,35 (C18:1) o 65,65-8,86 (C18:2) (García-Olmo et al., 2001; Fernández-Cabanás et al., 2007; Pérez-Marín et al., 2007a, 2010a). No obstante, hay que tener en cuenta que los colectivos de muestras de validación evaluados en esos estudios eran reducidos y no cubrían la amplia variabilidad de composición y años considerada en este trabajo. Este hecho, por tanto, puede justificar que los errores presentados en este estudio proporcionen una estima más real de la incertidumbre asociada al análisis de rutina cuantitativo de grasa fundida de cerdo ibérico en equipos monocromadores de laboratorio. También ha quedado de manifiesto en este estudio, la necesidad de utilizar conjuntamente estrategias de supervisión y recalibración de los modelos predictivos NIRS junto con el empleo de ficheros de repetibilidad para desarrollar modelos robustos.

5.1.3. Control y recalibración de modelos NIRS para la predicción de ácidos grasos en muestras de tejido adiposo subcutáneo intacto de cerdo ibérico

Introducción

En este apartado se expone un estudio similar al anterior. En este caso, el análisis se basa en muestras de tejido adiposo subcutáneo analizadas de forma intacta lo que simplifica la preparación de la muestra y reduce el tiempo de análisis. Para no resultar repetitivo, en este apartado no se detallan aspectos metodológicos ya explicados con anterioridad.

Material y métodos

El grupo de investigación ISPA contaba con una librería espectral de 786 muestras de grasa subcutánea intacta de cerdo ibérico, recogidas durante varios años (Tabla 5.1.3.1), analizadas en un equipo Foss NIRSystems 6500 (FNS, Foss NIRSystems Inc., Sylver Spring, MD, USA) equipado con una sonda de fibra óptica (García-Olmo et al., 1998). Dicho monocromador trabaja en el rango de longitudes de onda de 400-2.500 nm, con una resolución espectral de 2 nm. No obstante, el rango de los longitudes de onda entre 2.208 y 2.500 nm fue eliminado para el desarrollo de los modelos al mostrar un ratio señal/ruido bajo, en concordancia con otros autores (Pérez-Marín et al., 2009b). Los modelos cuantitativos fueron evaluados tanto en el rango 780-2.208 nm como en el rango 1.100-2.208 nm.

Tabla 5.1.3.1. Número de muestras de grasa subcutánea intacta analizadas en FNS por año.

	2003	2004	2007	2009	2010
Número de muestras	319	248	109	38	72

Una metodología similar a la del estudio 5.1.2 se ha utilizado en este estudio. Sin embargo, al no haberse analizado una muestra de grasa control, no se ha utilizado el fichero de repetibilidad para controlar posibles fuentes de variación como se ha demostrado en el apartado anterior. Disponer de una muestra representativa de control para su análisis frecuente sería algo ideal, pero este es un aspecto bastante complejo con tejidos adiposos intactos dada las posibles alteraciones de la muestra que pudiera sufrir durante su conservación, descongelación/congelación, etc. En este caso, al analizar la muestra intacta hay que tener en cuenta que sólo los cambios instrumentales (cambio de lámpara, fluctuaciones de la temperatura, etc.) son los que pueden afectar a posibles variaciones en las medidas espectrales, ya que al realizar el análisis de un producto intacto directamente, la degradación de la lámina de oro de las cápsulas necesarias para el análisis de la grasa fundida en transflectancia no existen.

Resultados y discusión

La Tabla 5.1.3.2 muestra los estadísticos descriptivos tanto del colectivo de calibración inicial (muestras de los años 2003-2007) como del colectivo de validación (muestras de los años 2009-2010), tras ser eliminados los anómalos espectrales en base a los valores GH del análisis PCA.

Tabla 5.1.3.2. Estadísticos descriptivos de las características del colectivo de calibración y validación.

Parámetro	Colectivo de calibración (644 muestras)				Colectivo de validación (103 muestras)			
	Media (%)	Min. (%)	Max. (%)	D.S. (%)	Media (%)	Min. (%)	Max. (%)	D.S. (%)
Palmítico (C16:0)	20,38	15,2	25,8	1,63	21,68	15,9	27,1	2,36
Estearico (C18:0)	9,32	5,4	14,4	1,28	10,40	7,0	17,0	2,08
Oleico (C18:1)	54,52	46,0	59,1	2,41	52,78	43,1	59,2	3,73
Linoleico (C18:2)	9,05	6,5	12,2	0,87	8,63	6,2	12,0	1,29

Min.: mínimo; Max.: máximo; D.S.: desviación estándar.

La Tabla 5.1.3.3 muestra los mejores modelos desarrollados en el rango de longitudes de onda entre 1.100 y 2.208 nm, tras eliminar los anómalos químicos en base a los valores T en el colectivo de calibración. Estos modelos no muestran grandes diferencias con los modelos desarrollados con el rango 780-2.208 nm. Los valores RPD_{cv} muestran la idoneidad de los modelos desarrollados para su empleo como método analítico. No obstante, cuando estos modelos iniciales son evaluados con muestras analizadas en años posteriores (2009 y 2010), los valores SEPs se duplican en comparación con los SECVs. Además, los valores RPD_p se reducen, incluso por debajo de 3, para todos los parámetros, lo que indica que los modelos deben ser recalibrados para mejorar la exactitud de los mismos. Los valores GH y NH, especialmente este último, están cerca o por encima de los valores límites para considerar una adecuada fiabilidad de las predicciones.

Los ácidos grasos analizados mostraron una desequilibrada distribución para el colectivo de calibración conformado por las muestras del año 2003, 2004 y 2007. Esto puede tener su repercusión en los resultados obtenidos. Se observó que había falta de muestras de la categoría “cebo” para tener una mejor distribución de los valores de referencia. Por esta cuestión, y basado en la estrategia definida por Zamora-Rojas et al. (2011), se seleccionaron 25 muestras de los años 2009 y 2010 para la recalibración de los modelos, quedando 78 muestras para validación externa. Por su parte, la Tabla 5.1.3.4 muestra los estadísticos descriptivos del colectivo de calibración incluyendo las 25 muestras para recalibración, tras ser eliminados los anómalos espectrales.

Tabla 5.1.3.3. Modelos de calibración para la predicción cuantitativa del perfil de ácidos grasos de muestras de grasa intacta.

Parámetro	N	Media (%)	Min. (%)	Max. (%)	D.S. (%)	No. PLS	SEC (%)	SECV (%)	R ²	RPD _{cv}	SEP (%)	RPD _p	GH	NH
Palmítico (C16:0)	634	20,35	17,2	25,8	1,58	12	0,36	0,40	0,93	3,95	1,30	1,21	2,91	2,01
Esteárico (C18:0)	646	9,32	6,2	14,4	1,28	12	0,36	0,40	0,90	3,2	0,57	2,24	2,91	2,01
Oleico (C18:1)	640	54,54	46,0	59,2	2,39	12	0,56	0,61	0,93	3,91	1,68	1,42	2,91	2,01
Linoleico (C18:2)	634	9,07	6,5	12,2	0,88	13	0,23	0,29	0,91	3,03	0,53	1,66	2,91	2,01
Rango de longitudes de onda: 1.100-2.208 nm														
Parámetro	N	Media (%)	Min. (%)	Max. (%)	D.S. (%)	No. PLS	SEC (%)	SECV (%)	R ²	RPD _{cv}	SEP (%)	RPD _p	GH	NH
Palmítico (C16:0)	611	20,36	17,2	25,8	1,58	11	0,37	0,41	0,93	3,85	1,19	1,33	2,72	1,63
Esteárico (C18:0)	626	9,32	6,7	14,4	1,24	15	0,40	0,42	0,88	2,95	0,61	2,03	2,72	1,63
Oleico (C18:1)	625	54,49	46,0	59,1	2,40	13	0,55	0,63	0,93	3,81	1,51	1,58	2,72	1,63
Linoleico (C18:2)	626	9,05	6,5	12,2	0,87	14	0,24	0,27	0,90	3,22	0,53	1,64	2,72	1,63

N.: número de muestras; Min.: mínimo; Max.: máximo; D.S.: desviación estándar; Rango de longitudes de onda: 780-2.208 nm; Intervalo entre longitudes de onda: 2 nm. Petratamiento: SNV+DT y segunda derivada (2,5,5,1).

Tabla 5.1.3.4. Estadísticos descriptivos de las características del colectivo de calibración y validación una vez seleccionadas las muestras para recalibrar.

Parámetro	Colectivo de calibración (660 muestras)				Colectivo de validación (78 muestras)			
	Media (%)	Min. (%)	Max. (%)	D.S. (%)	Media (%)	Min. (%)	Max. (%)	D.S. (%)
Palmítico (C16:0)	20,43	15,2	27,1	1,73	21,29	17,3	25,5	1,92
Esteárico (C18:0)	9,35	5,4	14,4	1,33	9,96	7,0	14,6	1,65
Oleico (C18:1)	54,44	45,6	59,2	2,53	53,58	45,8	59,1	3,04
Linoleico (C18:2)	9,04	6,5	12,2	0,89	8,74	6,7	12,0	1,18

N.: número de muestras; Min.: mínimo; Max.: máximo; D.S.: desviación estándar.

La Tabla 5.1.3.5 muestra los mejores resultados de los nuevos modelos de calibración una vez actualizados

Tabla 5.1.3.5. Modelos de calibración actualizados para la predicción cuantitativa del perfil de ácidos grasos de muestras de grasa intacta.

Parámetro	N	Media (%)	Min. (%)	Max. (%)	D.S. (%)	No. PLS	SEC (%)	SECV (%)	R ²	RPD _{cv}	SEP (%)	RPD _p	GH	NH
Palmítico (C16:0)	626	20,47	17,2	27,1	1,71	14	0,35	0,4	0,94	3,42	0,76	2,25	1,58	1,02
Esteárico (C18:0)	655	9,43	6,7	17,0	1,42	9	0,41	0,43	0,91	3,3	0,51	2,78	1,58	1,02
Oleico (C18:1)	638	54,52	43,1	59,2	2,56	12	0,57	0,62	0,94	4,13	0,89	2,87	1,58	1,02
Linoleico (C18:2)	640	9,01	6,2	12,2	0,91	14	0,23	0,27	0,91	3,37	0,63	1,44	1,58	1,02

N.: número de muestras; Min.: mínimo; Max.: máximo; D.S.: desviación estándar; Rango de longitudes de onda: 1.100-2.208 nm; Intervalo entre longitudes de onda: 2 nm. Pretratamiento: SNV+DT y segunda derivada (2,5,5,1).

Parámetro	N	Media (%)	Min. (%)	Max. (%)	D.S. (%)	No. PLS	SEC (%)	SECV (%)	R ²	RPD _{cv}	SEP (%)	RPD _p	GH	NH
Palmítico (C16:0)	625	20,42	17,2	27,1	1,66	13	0,36	0,42	0,93	3,95	0,86	1,93	2,2	1,28
Esteárico (C18:0)	640	9,36	6,7	14,4	1,29	9	0,42	0,42	0,88	2,93	0,55	2,34	2,2	1,28
Oleico (C18:1)	624	54,45	45,6	59,2	2,47	15	0,50	0,59	0,94	4,18	0,97	2,54	2,2	1,28
Linoleico (C18:2)	632	9,02	6,5	12,2	0,89	14	0,24	0,27	0,91	3,29	0,41	2,17	2,2	1,28

N.: número de muestras; Min.: mínimo; Max.: máximo D.S.: desviación estándar; Rango de longitudes de onda: 780-2.208 nm; Intervalo entre longitudes de onda: 2 nm. Pretratamiento: SNV+DT y segunda derivada (2,5,5,1).

La recalibración de los modelos, ampliados con tan sólo 25 muestras seleccionadas en base a la metodología propuesta por Zamora-Rojas et al. (2011), muestra una mejora de la capacidad predictiva de estos modelos. Los valores RPD_p incrementaron, frente a los valores iniciales (Tabla 5.1.3.2), la fiabilidad de las predicciones. De igual forma, los valores GH y NH también se vieron mejorados. Destaca que el valor RPD_p para la predicción de linoleico sea ligeramente inferior a 3, probablemente motivado por el estrecho rango (ejemplificado por el valor de desviación estándar) del colectivo en este parámetro. No obstante, al igual que se apuntó en la sección 5.1.2, estos valores se ven reducidos en parte a que muestras extremas (GH y/o NH elevados) fueron retiradas del colectivo de validación para ser incluidas en el colectivo de calibración actualizado.

De la misma forma que se expuso en el apartado 5.1.2, estos valores RPD son una estima más real de los errores que se pueden obtener en aplicaciones NIRS desarrolladas para el análisis *at-line* del perfil de ácidos grasos en muestras de tejido adiposo intacto, ya que se han obtenido con un amplio número de muestras recogidas en distintas campañas. Los valores descritos en la literatura son en la mayoría de los casos obtenidos con un colectivo muestras reducido o que sólo incluye la variabilidad de una campaña como son los casos de González-Martín et al. (2003) con valores de RPD_{cv} iguales a 3,16 (C16:0), 2,35 (C18:0), 2,50 (C18:1) ó 3,82 (C18:2) o como Pérez-Marín et al. (2009a) con RPD_{cv} de 3,65 (C16:0), 2,40 (C18:0), 3,33 (C18:1) o 2,28 (C18:2).

En general, se confirma, con estos tres estudios, la necesidad de controlar y recalibrar los modelos NIRS a lo largo del tiempo, ya que los resultados muestran claramente como los errores de predicción se pueden reducir a casi la mitad cuando se llevan a cabo estrategias como las presentadas en este capítulo.

5.2. Optimización de parámetros instrumentales y protocolo para el análisis espectral de productos cárnicos con equipos MEMS-NIRS portátiles

Existe una larga lista de factores que afectan a la calidad de las medidas instrumentales NIRS, ya que para el desarrollo de modelos robustos es tan importante tener un colectivo de calibración representativo y con datos de referencia de alta repetibilidad y fiabilidad como que la calidad de los espectros sea adecuada para obtener, posteriormente, la información de interés. En esta sección se pretende describir los resultados obtenidos de la experiencia que, durante esta tesis doctoral, se ha adquirido en cuanto a la optimización de parámetros instrumentales de equipos MEMS-NIRS, como de pautas de control y evaluación del instrumento que se deben realizar para la adquisición de espectros NIRS de alta repetibilidad y calidad.

El equipo portátil evaluado en esta tesis doctoral es el denominado Phazir™, diseñado con tecnología de sistemas micro-electro-mecánicos (MEMS) y que ha sido ampliamente descrito en la sección 3.3.4 de este documento. No obstante, el grupo de investigación al que se incorporó el autor de este documento adquirió, hace unos escasos meses antes de la defensa de esta tesis doctoral, la versión actualizada de dicho instrumento, llamado comercialmente MicroPhazir™ y que ha sido incorporada en algunos aspectos de esta sección para su discusión.

Ambos equipos MEMS-NIRS incorporan rutinas que permiten al usuario el cálculo del test de validación de funcionamiento (PQ, *Performance Qualification*) del instrumento, para conocer y evaluar el funcionamiento del mismo en términos de repetibilidad. Este test radica en la comparación de espectros tomados a lo largo del tiempo sobre un mismo material de referencia, evaluando la estabilidad del instrumento NIR (USPC, 2007). El objetivo de este test es asegurar que no se producen desvíos en las longitudes de onda del equipo o cambios debidos a variaciones de la incidencia de la iluminación en la sensibilidad del mismo durante el análisis. Concretamente, este test se compone de la determinación de distintos parámetros:

- Ruido fotométrico a alta intensidad (*Photometric Noise High Power*): permite evaluar el ruido instrumental a altas intensidades de luz. Para ello, se mide la reflectancia del material de referencia (99 % reflectante) como muestra y como material de referencia, calculándose el nivel de ruido mediante el estadístico RMS (información detallada en la sección 3.3.3) en segmentos de 100 nm a lo largo del rango espectral de instrumento.
- Ruido fotométrico a baja intensidad (*Photometric Noise Low Power*): permite evaluar el ruido instrumental a bajas intensidades de luz. Se

sigue un procedimiento similar al anterior, usando, en este caso, un material de referencia con una reflectancia del 10 %.

- Linealidad fotométrica (*Photometric Linearity*): normalmente se utiliza un colectivo formado por 4 materiales de referencia con distintos porcentajes de reflectancia para definir una ecuación lineal entre la absorbancia observada y la de referencia de cada material a tres longitudes de onda que cubran el rango del instrumento. En el caso del instrumento evaluado sólo se hace con dos materiales de referencia a 99 % y 10 % de reflectancia. Posteriormente, se calcula la pendiente e intersección de la recta que definen para su evaluación.
- Precisión de las longitudes de onda (*Wavelength Accuracy*): permite detectar desvíos en la dispersión de las longitudes de onda. Para ello, se procede a medir un espectro y determinar la posición de tres picos característicos de absorción que cubran todo el rango del instrumento.

Los límites para cada uno de estos parámetros que componen el test PQ fueron establecidos por el fabricante en base a las recomendaciones de la norma USPC (2007). Dichos límites se muestran en la Tabla 5.2.1. Además, en dicha tabla se muestran los valores para los distintos parámetros que los dos equipos disponibles en la Universidad de Córdoba muestran para una misma fecha. Se observa que el equipo evaluado en esta tesis doctoral (PhazirTM) presenta unos valores ligeramente superiores para todos los parámetros que los de MicroPhazirTM, si bien todos ellos están dentro de los límites recomendados, indicando el buen funcionamiento del equipo. Esto se debe principalmente a que el equipo PhazirTM, adquirido en el año 2007 y que desde entonces ha sido empleado en distintas aplicaciones con productos sólidos agroalimentarios como piensos, frutas, tejidos adiposos y músculos, ha sufrido un natural deterioro a lo largo de los años, además, de distintas modificaciones como la incorporación de un capuchón con un cristal de protección para la ventana de muestreo y la sustitución de la cápsula de referencia que también presenta un cristal de protección. Por su parte, el equipo MicroPhazirTM, de reciente adquisición, ha sufrido un escaso desgaste, además, incorpora un nuevo diseño de la ventana de muestreo que integra referencia interna, lo que hace que no intervengan tantas capas de cristal en las medidas como en el caso del primer equipo.

Tabla 5.2.1. Parámetros del test de validación del funcionamiento (PQ) con los límites establecidos por el fabricante y los valores de los equipos MEMS-NIRS Phazir™ y MicroPhazir™.

	Máximo o intervalo de confianza	Phazir™	MicroPhazir™
Ruido fotométrico a alta intensidad (1.800-1.900 nm)	0,0008	0,000135	0,000058
Ruido fotométrico a alta intensidad (1.900-2.000 nm)	0,0008	0,000079	0,000024
Ruido fotométrico a alta intensidad (2.000-2.100 nm)	0,0008	0,000178	0,000029
Ruido fotométrico a alta intensidad (99 %) Medio	0,0003	0,00013	0,000037
Ruido fotométrico a baja intensidad (1.800-1.900 nm)	0,002	0,000156	0,000074
Ruido fotométrico a baja intensidad (1.900-2.000 nm)	0,002	0,000146	0,000061
Ruido fotométrico a baja intensidad (2.000-2.100 nm)	0,002	0,000182	0,000062
Ruido fotométrico a baja intensidad Media	0,001	0,000161	0,000066
Linealidad fotométrica. Pendiente	1,0 ± 0,05	0,998571	1,000156
Linealidad fotométrica. Intersección	0,0± 0,05	0,00158	0,000159
Precisión de las longitudes de onda. Compensación	0,0 ± 10	-2,376357	-0,108621
Precisión de las longitudes de onda. Dispersión	0,0 ± 0,1	-0,037552	0,005121

No obstante, durante el desarrollo de esta tesis doctoral se observó que espectros tomados con el equipo Phazir™ para un mismo tipo de muestra no mostraban el mismo patrón espectral que en momentos anteriores, aunque el test PQ dio siempre valores correctos. Para ello, se comprobó el porcentaje de luz recibida en el equipo al medir el material de referencia (material reflectante 99 %). La Figura 5.2.1 muestra la evolución mensual de dicho parámetro para ambos equipos MEMS-NIRS. En general, se observa a lo largo del tiempo una reducción del porcentaje de luz reflejada tras incidir en el material de referencia lo que puede ser debido al natural deterioro de la lámpara del equipo o contaminación del material de referencia. Además, se observan algunas reducciones bruscas del porcentaje de luz reflejada capturada por el detector en momentos puntuales que tras una limpieza con un paño humedecido del material de reflectancia vuelve a los valores a los niveles esperados. Esto pone de manifiesto la precaución que hay que tener con la limpieza del material de referencia, en especial cuando el instrumento no cuenta con referencia interna.

En el año de 2010, se observa un descenso paulatino del porcentaje de luz reflejada lo cual podía deberse a un desgaste de la lámpara del equipo. No obstante, los voltajes del equipo no descendieron ni variaron bruscamente

durante ese periodo y sí se observó una desviación del espectro típico que se obtenía de muestras de grasa y músculo porcino con respecto a otros años. Esto hacía indicar una posible contaminación del material de referencia. Para comprobar este hecho se adquirió una nueva cápsula de material de referencia (99 %), aunque el diseño de la misma incorporaba un cristal protector lo que puede reducir o desviar un poco la luz reflejada que llega al detector. Los resultados obtenidos con ese nuevo material de referencia muestran un incremento notable del porcentaje de luz que llega al detector, lo que parece indicar que efectivamente se había producido una contaminación del material de referencia anterior. No obstante, en dicha época también se procedió a la sustitución de la ventana descubierta de muestreo por una que incorporaba un cristal de protección, lo que hace que en la medida del material de referencia estén presentes dos capas de cristal entre el material y el detector. Esto, junto con el posible deterioro de la lámpara, hace que sea normal alcanzar porcentajes entorno al 70 % de luz reflejada, en vez del 94 % inicial.

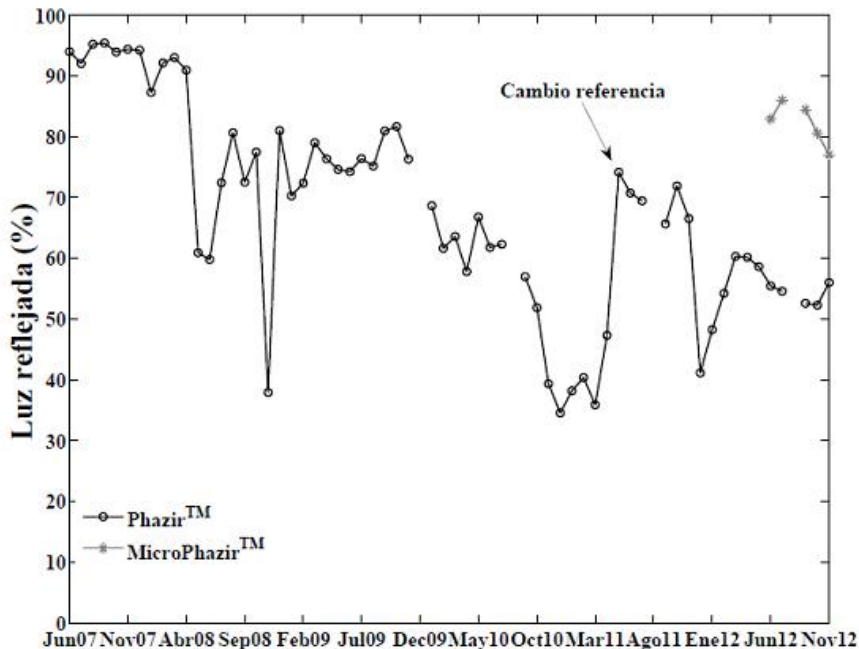


Figura 5.2.1. Evolución del porcentaje de luz reflejada por el material de referencia a lo largo del tiempo para los equipos MEMS-NIRS disponibles.

A tenor de estas observaciones, recomendamos extremar la precaución en cuanto al mantenimiento de los materiales de referencia, así como de la limpieza de los cristales de protección tanto del detector como del material de referencia (en caso de que sea externo). De hecho, ya que el test PQ no permitió la detección de estos fallos, se recomienda un control adicional de los diagnósticos de los equipos, en especial, del porcentaje de luz reflejada por el

material de referencia para comprobar el correcto funcionamiento del instrumento. Este se debe hacer al inicio de cada análisis o al menos semanalmente para evitar problemas mayores.

Por otro lado, en base a la experiencia del grupo de investigación en el que se ha desarrollado esta tesis doctoral y siguiendo las recomendaciones de distintas normas internacionales como ISO 12099:2010 (2010) o ASTM E1655-05 (2012), se debe incluir en el control rutinario de los equipos el análisis de una muestra de referencia lo más parecida posible a las muestras a analizar (*check sample*) para comprobar la correcta adquisición de espectros y su repetibilidad, independientemente de que, como se detalla en algunas publicaciones de esta tesis doctoral, se deban tomar varios espectros de una misma muestra y controlar su repetibilidad mediante el estadístico RMS.

De hecho, un aspecto clave para poder interpretar, discutir y evaluar dicho estadístico es caracterizar el ruido base del mismo en todo el rango espectral, es decir, calcular el valor medio de RMS del material de referencia. Para ello, se capturó 10 veces el espectro del material de referencia (99 % reflectante) y se procedió al cálculo del valor medio RMS. Se obtuvo un valor de 239,1 $\mu\log(1/R)$, muy semejante al obtenido en equipos de laboratorio como Foss NIRSystems, también empleado en esta tesis doctoral para el análisis intacto de tejido adiposo subcutáneo, que fue de 253 $\mu\log(1/R)$.

Otros factores que deben tenerse en cuenta y que permiten mejorar la calidad de los espectros adquiridos por equipos MEMS-NIRS son:

- Número de escaneos de la referencia: mayor número de escaneos de la referencia significa mayor estabilidad de la señal de fondo
- Número de escaneos por muestra: mayor número de escaneos por muestra significa mayor cantidad de luz que llega de la muestra y mejor calidad del espectro.
- Tiempo de calentamiento de la lámpara: a mayor tiempo, mayor estabilidad de la lámpara durante el análisis.
- Máximo tiempo entre medidas de referencia: a menor tiempo entre medidas de referencia, mejor control del equipo y menor efecto de posibles factores variables durante el análisis.

No obstante, se debe tomar una decisión de compromiso de los valores de estos parámetros para obtener espectros de alta calidad sin incrementar en exceso el tiempo de análisis. En la Tabla 5.2.2 se muestra el tiempo de integración del equipo portátil MEMS-NIRS junto con el de otros equipos portátiles y de laboratorio.

Tabla 5.2.2. Tiempos de medidas para distintos equipos NIRS de laboratorio y portátiles.

	Tiempo de integración (microsegundos)	Números de escaneos/medida *	Tiempo/medida (segundos)
Foss NIRSystems 6500	1.875.000	32	60
Phazir™ 1624	600.000	5	3
MicroNIR™ 1700	100	10.000	1

* número de escaneos de la muestra recomendados por los fabricantes.

En la presente tesis doctoral, se han realizado distintos estudios que han sido presentados en comunicaciones a congresos internacionales y recogidos al final de este documento (sección 9.1), sobre la influencia que tienen estos parámetros en la calidad/repetibilidad del espectro de muestras de músculo porcino (Póster en Proceedings of the 14th International Conference on NIR Spectroscopy; Póster en VII International Symposium on the Mediterranean Pig).

Otros de los aspectos que se debe tener en cuenta a la hora de utilizar equipos portátiles MEMS-NIRS es el tamaño de ventana el área de muestreo, ya que esta es muy pequeña. En esta tesis doctoral se ha puesto de manifiesto, como se detalla en las publicaciones que recoge este documento (ver sección 5.3.1, 5.3.2 y 5.4.1), la necesidad de tomar varios puntos de análisis a lo largo de la superficie de la muestra, ya sea de grasa intacta o carne picada, para obtener un espectro medio representativo.

Por tanto, y teniendo en cuenta todo lo anterior y la experiencia adquirida en el trabajo con este tipo de instrumentación portátil NIRS, se recomienda la siguiente rutina de análisis:

- 1.- Encender equipo. Tiempo de calentamiento de la lámpara recomendado: 2 minutos.
- 2.- Limpiar la ventana con especial cuidado utilizando un paño semiseco.
- 3.- Realizar el análisis PQ para comprobar el estado del equipo. Es recomendable guardar esos resultados en un fichero histórico para ir analizando la evolución del estado del equipo. Posibilidad de descargar estos ficheros en la opción "Obtener diagnósticos" del equipo. Este procedimiento es recomendable realizarlo al menos una vez a la semana mientras esté en uso el instrumento.
- 4.- Una vez comprobado el estado del equipo, seleccionar la aplicación más adecuada disponible en el mismo según el producto a evaluar. Es posible desarrollar aplicaciones a la carta con el software Polychromix Method Generator™.

5.- Realizar el análisis de las muestras teniendo en cuenta el número de medidas necesarias para obtener un espectro representativo de la muestra. En el caso de carne picada de cerdo ibérico se consideró 2 medidas espectrales por sub-muestra y en el caso de canales de cerdo ibérico 4 medidas.

6.- Descargar los ficheros del equipo, tanto el fichero que contiene las medidas espectrales como el de diagnóstico.

La adquisición de los datos procedentes de equipos MEMS-NIRS se realiza con un software propio del instrumento, mientras que el análisis matemático-estadístico de los mismos es recomendable realizarlo en otros tipos de software como WinISITM, MATLAB[®], The Unscrambler[®], entre otros, ya que el software que vende el fabricante (Thermo Fisher Scientific Inc.) es bastante limitado en esos aspectos, aunque es de resaltar la sección que tiene para el desarrollo de ejecutables que contienen modelos NIRS que pueden ser integrados directamente en el equipo para obtener predicciones en tiempo real en el visor del equipo. Para una correcta importación de datos espectrales procedentes de equipos MEMS-NIRS (PhazirTM y MicroPhazirTM) a software de tratamiento matemático-estadístico potentes se ha redactado un manual titulado “Manual práctico para el procesamiento de datos procedentes de equipos PhazirTM”, y recogido en la sección 9.3, que indica las pautas más recomendables para importar a WinISITM, un software de tratamiento quimiométrico ampliamente utilizado en el sector agroalimentario, como a MATLAB[®], que ofrece un mayor potencial de trabajo y funcionalidades, ficheros con datos espectrales de estos instrumentos.

5.3. Control de calidad cualitativo y cuantitativo de canales de cerdo ibérico *in situ* en la línea de faenado

En esta sección se recogen los resultados obtenidos en cuanto al desarrollo de modelos cualitativos y cuantitativos para el control de calidad de canales de cerdo ibérico analizadas *in situ* en la línea de faenado con equipos NIRS basados en sistemas micro-electro-mecánicos (MEMS).

La publicación 5.3.1 se refiere al desarrollo de modelos cualitativos para clasificar canales de cerdo ibérico según el régimen alimenticio de estos durante los 2 últimos meses previos al sacrificio atendiendo a las categorías establecidas en la Norma de Calidad, mientras en la publicación 5.3.3 se desarrollan modelos cuantitativos para el análisis del perfil de ácidos grasos. En ambos estudios se analizan la grasa dorsal subcutánea de la canal a unos 10 cm del rabo tras 2 horas post-mortem. Los resultados obtenidos con los equipos portátiles son comparados con otros tipos de instrumentación NIRS de laboratorio y modos de presentación de muestra, a fin de poder conocer más fielmente la amplitud de la pérdida de capacidad predictiva cuando nos alejamos del “ideal”, esto es análisis NIRS de grasa fundida en equipos monocromadores de amplio rango y altas prestaciones científico-técnicas trabajando en condiciones de laboratorio. Asimismo, estos estudios comparativos se utilizan para establecer algunas hipótesis sobre los factores que mayor peso pueden tener en la supuesta pérdida de capacidad predictiva de los modelos debido a las diferencias específicas entre ambos tipos de instrumentos evaluados.

Dado que los equipos MEMS-NIRS no cuentan con un software propio lo suficientemente potente para realizar un adecuado análisis matemático-estadístico de los datos espectrales medidos, resulta interesante evaluar algoritmos, tanto cualitativos como cuantitativos, que puedan ser implementados en software propios. En este sentido, en el apartado 5.3.2 se recoge la evaluación de distintos algoritmos cualitativos, de código libre, para la clasificación *in situ* de canales de cerdo ibérico analizados en equipos MEMS-NIRS; mientras que en la publicación 5.3.3 se realiza al similar desde una perspectiva cuantitativa.



IN-SITU IBERIAN PIG CARCASS CLASSIFICATION USING A MICRO-ELECTRO-MECHANICAL SYSTEM (MEMS)-BASED NEAR INFRARED (NIR) SPECTROMETER



In-situ Iberian pig carcass classification using a micro-electro-mechanical system (MEMS)-based near infrared (NIR) spectrometer

E. Zamora-Rojas*, D. Pérez-Marín, E. De Pedro-Sanz, J.E. Guerrero-Ginel, A. Garrido-Varo

Department of Animal Production, Non-destructive Sensor Unit, Faculty of Agricultural and Forestry Engineering, University of Córdoba, Agrifood Campus of International Excellence (ceiA3), Campus Rabanales, N-IV, km 396, Córdoba 14014, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 July 2011

Received in revised form 3 October 2011

Accepted 13 October 2011

Keywords:

Iberian pig
In-situ analysis
NIRS
Authentication
Feeding regime
MEMS device

ABSTRACT

Iberian pig (IP) products are gourmet foods highly appreciated at international markets, reaching high prices, because of its exquisite flavors. At present, there aren't practical and affordable analytical methods which can authenticate every single piece put on the market. This paper reports on the performance of a handheld micro-electro-mechanical system (MEMS)-based spectrometer (1600–2400 nm) for authentication–classification of individual IP carcasses into different commercial categories. Performance (accuracy and instrumental design) of the instrument was compared with that of high-resolution NIRS monochromators (400–2500 nm). A total of 300 carcasses of IPs raised under different feeding regimes (“Acorn”, “Recebo” and “Feed”) were analyzed in three modes (intact fat in the carcass, skin-free subcutaneous fat samples and melted fat samples). The best classification results for the MEMS instrument were: 93.9% “Acorn” carcasses correctly classified, 96.4% “Feed” and 60.6% “Recebo”, respectively. Evaluation of model performance confirmed the suitability of the handheld device for individual, fast, non-destructive, low-cost analysis of IP carcasses on the slaughterhouse line.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Iberian pork products are high-quality products enjoying worldwide prestige due to their exceptional organoleptic and health-related properties (Cava, Ventanas, Ruiz, Andrés, & Antequera, 2000 and Ventanas, Ruiz, García, & Ventanas, 2007). In recent years, moreover, the agro-sylvo-pastoral production system traditionally used to produce these high-quality products has provided a “sustainable” and “natural” label to the Iberian pork products. Spanish legislation classifies Iberian pig (IP) products into different categories depending on the feeding regime and production system involved (BOE, 2007): “Acorn” (i.e. free-range animals fed on grass and acorns), “Recebo” (i.e. animals fed on acorns and grass supplemented with compound feeds in an outdoor system) and “Feed” (i.e. animals fed on compound feeds in an intensive system). The terms “Acorn”, “Recebo” and “Feed” are used in the paper to refer to samples from animals belonging to each of the three commercial categories; “Acorn” category being the highest priced, followed by “Recebo” and then by “Feed”.

These categories reflect the impact of the feeding regime – particularly during the final fattening stage – on fatty acid composition and fat distribution in tissues (Carraspiño, Bonilla, & García, 2003; Petrón, Muriel, Timón, Martín, & Antequera, 2004; Daza et al., 2006a and Garrido & De Pedro, 2007), an impact also influenced by other factors

such as genotype, gender, feeding regime during the period before the late fattening stage, age at the beginning of fattening, age and weight at the slaughter, environmental and rearing conditions (Pérez-Serrano, 2008 and Bonneau & Lebret, 2010). Iberian pork products share a characteristic high unsaturated/saturated fatty acid ratio and extraordinary sensory attributes. Moreover, feeding regime influences the quality, contributing to the existence of different price premiums for each category in the Spanish and international markets.

The official quality-control systems used for determining the IP feeding regime are based on on-farm inspection and laboratory analysis of the fatty-acid composition of melted subcutaneous fat using gas chromatography (GC) (BOE, 2007). However, these methods are costly and time-consuming, and only provide information on batches of animals rather than individual pigs. Production is constantly increasing, and demand is growing (Daza, Olivares, Rey, Ruiz, & López-Bote, 2006b); rigorous control procedures are therefore required to ensure the traceability, authentication and quality of Iberian pork products, in order to guarantee product homogeneity and satisfy consumer expectations.

Innovative analytical methods and technologies are increasingly being researched for the classification of IP products by genotype or feeding regime such as DNA tests, gas chromatography (GC) analysis for fatty acid profile, gas chromatography–mass spectroscopy (GS-MS) or electronic nose for volatile compound analysis, high performance liquid chromatography (HPLC) combined with GC to detect and quantify hydrocarbons, antioxidants and/or triacylglycerols, ultrasonic measurements, isotopic analysis, image texture analysis

* Corresponding author at: Campus Rabanales, N-IV, km 396, 14014 Córdoba, Spain. Tel./fax: +34 957 21 85 55.

E-mail address: ezamora@uco.es (E. Zamora-Rojas).

based on magnetic resonance imaging (MRI) and ion mobility spectroscopy (IMS). Most of the studies in the literature on this topic have mainly been concerned with the ability of a given method or technology to differentiate between the extreme categories “Acorn” and “Feed”, and do not include samples of the “Recebo” group, whose intermediate nature renders classification more complex.

Each of these techniques shows certain advantages and disadvantages, but they all have major barriers for widespread use in the IP industry: time-consuming, analysis cost, complexity or destruction of the samples (not the case for ultrasonic or imaging techniques). However, an objective, low cost and real time control system for the authentication of individual ham pieces would enable farmers to be paid by animal, with the premium appropriate to the commercial category, rather than by batches whose commercial composition may vary; it would also ensure rigorous internal production-quality controls enabling more efficient marketing decisions. At the same time, a more objective certification system would boost consumer confidence.

Over the last decades, Near Infrared Spectroscopy (NIRS) has shown its potential for meat analysis (Prevolnik, Candek-Potokar, & Skorjanc, 2004; Prieto, Roehe, Lavín, Batten, & Andrés, 2009 and Weeranantaphan, Downey, Allen, & Sun, 2011) more specifically for the classification of IP products by feeding regime. Early papers in the field showed the high precision and accuracy of NIRS multivariate models for the prediction of fatty acids and discrimination of the feeding regime by analyzing melted fat taken from IP carcasses and using monochromator instruments (De Pedro, Garrido, Lobo, Dardenne, & Murray, 1992; De Pedro, Garrido, Lobo, Dardenne, & Murray, 1995; Hervás, Garrido, Lucena, García, & De Pedro, 1994; García-Olmo, Garrido-Varo, & De Pedro, 2001; García-Olmo, Garrido-Varo, & De Pedro, 2009; Fernández-Cábanas, Garrido-Varo, García-Olmo, De Pedro-Sanz, & Dardenne, 2007; Pérez-Marín, Garrido-Varo, De Pedro, & Guerrero-Ginel, 2007 and Arce et al., 2009). At present, several official laboratories are using this technology to provide support to producers and industries of the IP sector replacing gas chromatography (GC) analysis. Later, several authors (García-Olmo, Garrido, & De Pedro, 1998; González-Martín, González-Pérez, Hernández-Méndez, & Álvarez-García, 2003 and Pérez-Marín, De Pedro, Guerrero-Ginel, & Garrido-Varo, 2009) demonstrated the viability of NIRS analysis of intact fat or adipose tissue using monochromator instruments equipped with a remote fiber optic probe. These studies have not only shown the potential of NIRS technology to replace the more expensive and time demanding GC analysis of the IP fat, but also its ability to use NIRS spectra information “per se” for a more accurate classification of IP carcasses in the existing commercial categories (Hervás et al., 1994; De Pedro et al., 1995 and García-Olmo et al., 2009). More recently a study assessed the viability of the on-line NIRS analysis of carcasses and live animals in the slaughterhouse using a portable instrument with a fiber optic accessory (Pérez-Marín et al., 2009). However, the instrument has the limitations of high cost and time required for measurements and also technical limitations due to its weight (5.6 kg), external reference or the fiber optic accessory; longer distance, less sensitivity.

New portable handheld devices, combining small size, robustness, low cost and ease of use, have appeared over the last few years. These enable NIRS technology to be implemented in environments for which traditional instrument designs are unsuitable. Near-infrared spectrometers using micro-electro-mechanical systems (MEMS) technology provide several specific advantages. The combination of MEMS with transform mathematics such as digital transform spectroscopy (DTS) produces powerful spectrometers. A MEMS chip, equipped with a fixed diffraction grating, can constitute a rapidly-programmable high-contrast pixilated optical reflector working as a tunable spectral filter, and combined with a single detector can reduce equipment costs and eliminates detector noise. Additionally, the robust design with non-moving parts makes the instrument

particularly useful for in-situ measurements (Day et al., 2005 and Wolffenbuttel, 2005). This technology represents a shift for industrial spectroscopy applications, opening up new scope for spectroscopic sensors (Crocombe, 2004).

The aim of the present study was to evaluate a handheld MEMS-NIRS instrument for in-situ classification of individual IP carcasses by feeding regime in the slaughterhouse, comparing its performance with that of high-resolution monochromators and assessing its value for practical use in the IP industry. The high-resolution NIR spectrometers used for comparison purposes are those that are used at-line in laboratories and some IP industries, either for the analysis of melted fat or intact adipose tissue.

2. Materials and methods

2.1. Sample set

Three hundred Iberian pig carcasses (Pure Iberian and Iberian-Duroc crossbreds) from two commercial Spanish slaughterhouses were analyzed. Pigs were slaughtered over two seasons (2008/2009 and 2009/2010), at the age of 12 months for the “Feed” animals and 14 months for the other categories; average weight was 160 kg. One hundred pigs were drawn from each of the three feeding regimes: “Acorn”, “Recebo” and “Feed”; authentication of the feeding regime was monitored by trained personnel in on-field inspection.

2.2. NIRS measurements

Spectra were collected using a handheld instrument of particular value for in-situ applications, and also using high-resolution monochromators for comparative purposes:

1. A handheld micro-electro-mechanical system (MEMS) digital transform spectrometer (2 kg weight) (Phazir 1624, Polychromix Inc., Wilmington, MA, USA), working in reflectance mode in the spectral range 1600–2400 nm with a non-constant interval of around 8 nm (pixel resolution 8 nm, optical resolution 12 nm). Sensor integration time was 600 ms. The device is equipped with quartz protection to prevent dirt accumulation. Transverse sections of intact subcutaneous fat were obtained directly from the tail insertion area of carcasses around 2 hours post-slaughter chilled in a temperature controlled chamber (Fig. 1). Four spectra per carcass were collected over the sample area. Sample temperature during measurements at the slaughterhouse was 15–18 °C.
2. Two Foss NIRSystems (FNS) 6500 spectrometers (Foss-NIRSystems Inc., Sylver Spring, MD, USA), one equipped with a fiber optic for intact analysis of subcutaneous tissue and another equipped with a spinning module for melted subcutaneous fat analysis were used for comparison purposes. The instruments operate in the spectral range 400–2500 nm with a spectral resolution of 2 nm. Two sample presentation modes were evaluated in the laboratory: skin-free transverse sections of subcutaneous adipose tissue and melted fat samples. Melted fat samples were prepared following De Pedro, Casillas, and Miranda (1997) and analyzed using folded-transmission gold reflector cups with a pathlength of 0.1 mm. Samples were obtained from the same area as for the MEMS measurements, and were stored at –20 °C until 24 h before at-line NIRS analysis in the laboratory. Duplicate spectra were collected. Sample temperature in the laboratory was 18–20 °C.

2.3. Data pre-treatment

Chemometric calculations were performed using different software packages: WinISI package ver 1.50 (Infrasoft International, Port Matilda, PA, USA) for performing spectral repeatability analysis, principal component analysis, and PLS2 discriminant analysis; and



Fig. 1. In-situ NIRS carcass analysis performed with a handheld MEMS instrument.

MATLAB ver 7.6 (The MathWorks, USA) for interpolation of the Foss NIRSsystems (FNS) data to the handheld MEMS-NIRS instrument.

2.3.1. Spectral repeatability

Before averaging the spectra for each sample, spectral repeatability of intact skin-free subcutaneous fat was evaluated using the Root Mean Squared (RMS) statistic to eliminate spectra displaying considerable variations. Twenty-two samples were analyzed for this purpose. Four spectra were collected from each sample in the handheld MEMS instrument, always at the same location, and two duplicates were collected using the FNS instrument equipped with a fiber optic.

The RMS statistic is the averaged root mean square of differences between the different subsamples scanned at n wavelengths (Shenk & Westerhaus, 1995, 1996). The RMS for an individual sample (j) is defined as:

$$RMS_j = 10^6 \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n D_{ij}^2}{n}}; \quad D_{ij} = y_{ij} - \bar{y}_i$$

where y_{ij} is $\log(1/R)$ at wavelength i for subsample j and \bar{y}_i is $\log(1/R)$ at wavelength i for the mean spectrum of N subsamples of a sample; n is the number of data points collected by the instrument (here, 100 data points for the MEMS-NIRS instrument and 1050 data points for the FNS instrument).

In order to determine the admissible limit for spectrum quality and repeatability for each instrument and sample presentation mode, the standard deviation (STD) limit was used to obtain an RMS cut-off value (Martínez, Garrido, De Pedro, & Sánchez, 1998):

$$STD_{\text{limit}} = 1.036 \times \sqrt{\frac{\sum_{k=1}^{k-m} STD_k^2}{m}}$$

where STD is the standard deviation per sample and m is the number of samples. The STD per sample was defined as:

$$STD = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^N (RMS_j)^2}{(N-1)}}$$

where N is the number of sub-samples.

2.3.2. Principal Component Analysis and detection of spectral outliers

Principal Component Analysis (PCA) was performed on each set (i.e. each instrument and mode of sample analysis) in order to decompose and compress the data matrix. After PCA, the center of the spectral population was determined in order to detect outlier samples. The Global Mahalanobis distance (GH) was calculated between each sample and the center; samples with a GH value greater than 3

were considered outliers (Shenk & Westerhaus, 1996). As spectral pre-treatments, the Standard Normal Variate (SNV) followed Detrending (DT) (Barnes, Dhanoa, & Lister, 1989) algorithms to remove the multiplicative interferences of scatter. Four window-wise filtering derivative mathematical treatments were performed: (1,5,5,1), (1,10,5,1), (2,5,5,1) and (2,10,5,1) where the first digit is the order of the derivative, the second is the gap over which the derivative is calculated, the third is the number of data points in a running average or smoothing, and the fourth is the second smoothing (ISI, 2000).

Spectral outlier detection was performed first with the full population and then within each feeding category, for each instrument and sample mode analysis. Thus, using the MEMS instrument, outlier samples were detected and removed from the full population and then from each feeding category. The remaining samples were then studied using the FNS instrument: outliers were detected and removed using the skin-free subcutaneous fat mode and then the melted fat mode. As a result, the final sample set contained no common or specific spectral outliers, and the same number of samples was available for each form of presentation, in order to facilitate comparison.

2.3.3. Definition of training and validation sets

After outlier detection, the final sample set comprised 279 of the original 300 samples: 97 "Acorn", 84 "Feed" and 98 "Recebo". Calibration models were therefore unbalanced. Some authors argue that better results are obtained when the training sets used for discriminant analysis have a similar structure (Downey, 2000 and Sánchez, Flores-Rojas, Guerrero, Garrido-Varo, & Pérez-Marín, 2010). However, when working with samples from extensively-raised pigs – where backfat composition and therefore commercial category may be affected by the natural resources available (Tejerina, García-Torres, Cabeza deVaca, Vázquez, & Cava, 2011) and by individual variations in metabolism – it is advisable to maximize individual variability in the models (Pérez-Marín et al., 2009); this can be achieved by using the largest possible sample numbers.

Samples for training and validation sets were selected following Shenk and Westerhaus (1991), using the CENTER algorithm included in the WinISI software (option "create score file from spectra file") to calculate the Global Mahalanobis distance (GH). The samples were ordered based on the Mahalanobis distance to the center of the population for each feeding category, and one of every three samples in each feeding group was selected to be part of the validation set (33 "Acorn", 28 "Feed" and 33 "Recebo"). The remaining samples were part of the training set (64 "Acorn", 56 "Feed" and 65 "Recebo"). This selection was based on the samples analyzed with the MEMS-NIRS instrument (skin-free subcutaneous fat measurements in the carcass), since this presentation mode was appropriate for in-situ analysis.

2.3.4. PLS2-Discriminant analysis algorithm

Partial Least Squares Discriminant Analysis (PLS2-DA) was applied to classify samples into each of the commercial categories studied. This model seeks to correlate spectral variations (X) with defined classes (Y), attempting to maximize the covariance between the two types of variables for group differences and ignoring variance within a class. In this type of approach, the Y is a dummy matrix with arbitrary numbers assigned to the different classes to be distinguished (Naes, Isaksson, Fearn, & Davies, 2002).

The optimum number of model factors was selected by cross-validation using 4 groups. Different signal pre-treatments were evaluated for qualitative model development: no scatter correction (none) pre-treatment, Multiplicative Scatter Correction (MSC) and SNV followed of DT. First and second derivative were also evaluated. Models were obtained in the 1600–2208 nm spectral range for the handheld MEMS instrument, while the 450–2208 nm, 1100–2208 nm and 1600–2208 nm regions were used for the FNS monochromator in the intact

subcutaneous adipose tissue analysis. In the case of melted fat in the FNS instrument, 450–2500 nm, 1100–2500 nm and 1600–2208 nm were evaluated. The wavelength range 1600–2208 nm was evaluated in all the instruments for comparison purposes, since this is the suitable range for the MEMS-NIRS instrument.

To facilitate comparison of the performance of the two instruments, the 1050 wavelengths of the monochromator were interpolated to the 100 wavelengths of the handheld instrument. Since the spectral resolution of the handheld MEMS instrument is non-constant, piecewise cubic interpolation (Fernández-Pierna, Vermeulen, Lecler, Baeten, & Dardenne, 2010) was required to preserve convexity for scattered data. Discriminant models were then constructed for purposes of comparison.

The accuracy of the models obtained was evaluated using the percentage of correctly classified samples. The best-fitting models, as selected by statistical criteria, were validated.

3. Results and discussion

3.1. Spectral repeatability and spectrum range optimisation

The collection of high-quality spectra is critical for the characterization of samples by commercial category and thus for the construction of qualitative discriminant models. The RMS cut-off values calculated as indicated in Section 2.3.1. were: 10912 $\mu\log(1/R)$ for the FNS using the fiber optic with intact skin-free backfat samples and 11955 $\mu\log(1/R)$ for the MEMS-NIRS instrument used in-situ with carcasses at the slaughterhouse, considering the full spectral range for each instrument. Similar spectral repeatability was observed for the instruments and sample presentation modes assayed, despite differences in analytical conditions (in-situ vs. laboratory) and instrumental specifications (spectral range and resolution).

Although average spectra show a normal shape at all the wavelengths (Fig. 2), spectral areas with low signal/noise ratio in the full data set analysis were observed. Intact adipose tissue measured on the carcass with the MEMS-NIRS instrument showed that noisy tendency in the region 2208–2400 nm (25 variables); while in the FNS for intact fat it was observed in the regions 400–450 nm and 2208–2500 nm. To check the influence of these noisy tendencies in the spectra, the RMS cut-off values were calculated by attenuating the range; eliminating those spectral areas with a very low signal/noise ratio. In the case of FNS for the range 450–2208 nm, a RMS cut-off of 5012 $\mu\log(1/R)$ was obtained; while for the MEMS instrument (1600–2208 nm) repeating the measurements in the same location was 9255 $\mu\log(1/R)$.

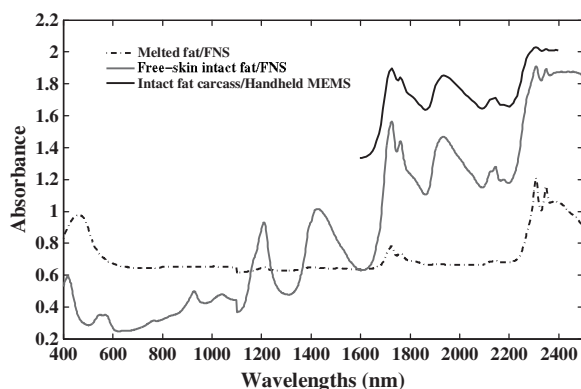


Fig. 2. Average spectra collected in three analysis modes.

However, a practical RMS cut-off was established for the MEMS instrument, since its sampling area (0.8×1 cm) is very small, and spectra collected from the same position may be not sufficiently representative of the full sample, given that IP backfat is composed of two adipose tissue sub-layers with slight differences in fatty acid composition (Daza, Ruiz-Carrascal, Olivares, Menoyo, & López-Bate, 2007). Four spectra were therefore collected over the transverse section of each carcass of the 22 pigs studied. A value of 42554 $\mu\log(1/R)$ was obtained (1600–2208 nm). This increase in the RMS cut-off value reflected sample heterogeneity rather than instrument performance. Moreover, sub-scans were collected along the transverse section which is also affected by blood presence, surface shape and fissures of the tissue.

For the FNS instrument, any replicate higher than the calculated value was repeated until values fell below that limit, thus ensuring a high degree of spectrum repeatability. For the handheld MEMS instrument, any replicate above the practical limit (i.e. 43000 $\mu\log(1/R)$) was eliminated from the library. The mean spectrum of the replicates of each sample was then used for further analysis.

In the case of melted fat measurements in FNS with folded-transmission gold reflector cups a RMS cut-off of 4000 $\mu\log(1/R)$ was used for spectra repeatability control (García-Olmo, 2002).

3.2. Spectrum interpretation

Average spectra for each analysis mode are shown in Fig. 2. Certain similarities were apparent: solid and melted fat samples analyzed either at the slaughterhouse or in the laboratory displayed very similar patterns, with absorption bands related to water (1400, 1940 nm), except in melted fat, and others related to lipids/fat (around 930, 1040, 1200, 1720–1760, 2150, 2310–2340 nm) (Williams & Norris, 1987; Osborne, Fearn, & Hindle, 1993 and Garrido-Varo, García-Olmo, & Pérez-Marín, 2004). Moreover, melted fat samples exhibited sharper lipid peaks, specifically in the 2200–2400 nm range with no water interference. Comparison of instruments using the same sample presentation (i.e. skin-free intact fat) revealed the same absorbance bands. However, peaks were better defined in the FNS instruments, probably due to higher spectral resolution.

As mentioned before, although average spectra show a normal shape at all wavelengths, the noisy regions detected in the spectra should not be considered in the models.

3.3. PLS2-DA algorithm

3.3.1. Construction of discriminant models

The discrimination models constructed using the commercial handheld MEMS instrument and various scatter/derivative pre-treatments are shown in Fig. 3. The percentage of pigs correctly assigned to the “Recebo” category was lower than that of pigs correctly classified as “Acorn” or “Feed” independent of the spectra pre-treatment; this reflects the fact that the “Recebo” feeding regime is intermediate between the other two, and includes characteristics of each. A second derivative with a gap of 5 nm with no scatter correction (none) pre-treatment generally provided the best validation results for the three feeding-regime classification, since from the market point of view it is more important to get better discrimination within “Acorn” and “Feed” groups (extreme categories with the lowest and highest prices) than with the “Recebo” group.

Results obtained with the handheld MEMS instrument were compared with those obtained using the at-line monochromators, whose viability for classification by feeding regime has been demonstrated in earlier studies. The results are shown in Table 1. As expected the best predictive ability was recorded for the model constructed using the FNS instrument for the analysis of melted fat. This is reasonable since melted fat analysis provided sharp bands related to fat, no interference from water and the homogeneity of the samples is larger.

Using subcutaneous carcass fat analyzed with the MEMS-NIRS instrument, 93.9% of the “Acorn” samples in the validation set were correctly-classified, compared with 96.4% of the “Feed” samples and 60.6% of the “Recebo” samples. Four “Recebo” samples (12.1%) were misclassified as “Feed”; nine “Recebo” samples (27.3%) as “Acorn”. This is an acceptable error since, although the feeding regimes were controlled by trained personnel, the variability of natural resources available in the field can influence the individual variability of the animals, so that not all the animals

have the same characteristics (Tejerina et al., 2011). FNS results were better than those of the MEMS instrument (Table 1). The best FNS results were obtained with the wavelength range 450–2208 nm for intact fat and 450–2500 nm for melted fat. The percentage of correctly-classified samples was higher, in all categories, using melted fat analysis than skin-free intact fat, except in the “Feed” group, where the same number of validation-set samples was correctly classified.

Analysis of the results obtained using the FNS instrument using a fiber optic probe for skin-free intact fat samples shows that the number of correctly-classified “Acorn” samples declined by 3.0% when the wavelength range was reduced from 450–2208 nm to 1100–2208 nm; a 7.1% decrease was observed in the “Feed” category and 9.1% for the “Recebo” group (Table 1). This reduction in wavelength range may have removed some spectral information useful for inter-group discrimination, such as the fat-related absorption bands around 930 and 1040 nm (Garrido-Varo et al., 2004). Similar results were obtained for subcutaneous fat measured directly in the carcass (handheld MEMS) and in the laboratory (FNS), except for the “Recebo” category (Table 1). The percentage of correctly-assigned samples in the “Recebo” group was 27.3% lower using the handheld MEMS-NIRS instrument. Taking into account factors possibly influencing instrument performance, such as the environment (slaughterhouse vs. laboratory); fat presentation mode (carcass vs. piece of fat/fresh vs. thawed); measurement time (5 s vs. 90 s); instrument spectral range (1600–2208 nm vs. 450–2208 nm); and instrument resolution (8 nm vs. 2 nm), the handheld spectrometer displayed acceptable predictive ability, and it was clearly more practical for in-situ use.

The results obtained using melted fat samples may be regarded as the target predictive ability of NIR technology: 96.9% of “Acorn” samples, 96.4% of “Feed” and 100% of “Recebo” samples in the validation set were correctly classified. One “Acorn” sample (3.1%) was misclassified as “Recebo”. Also, one “Feed” sample was misclassified as

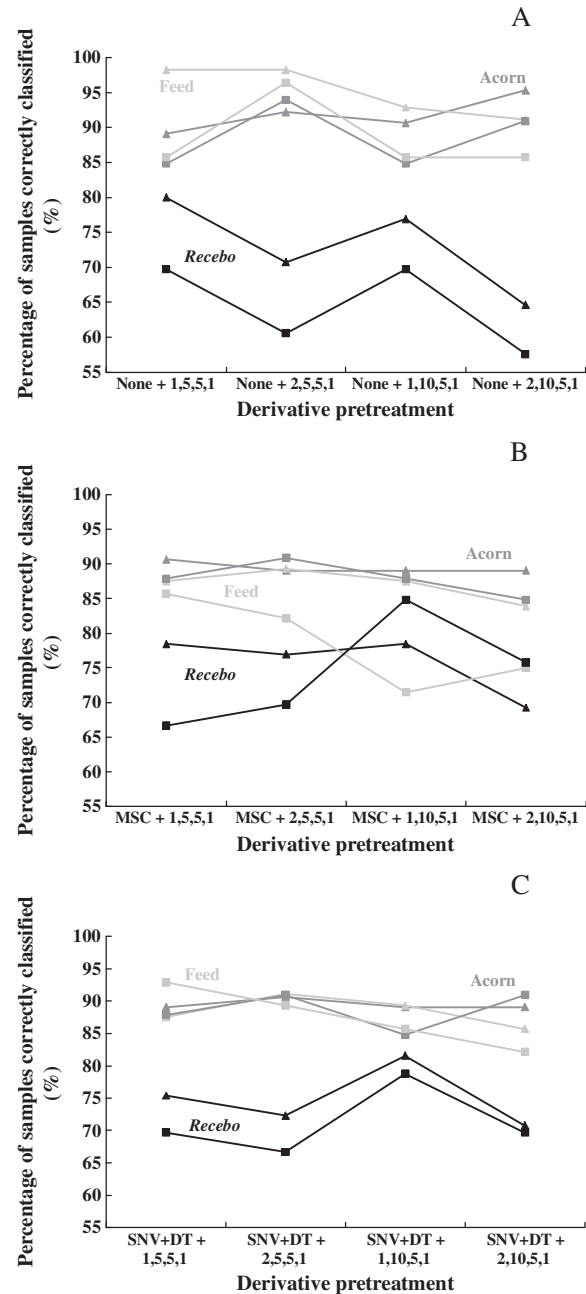


Fig. 3. Percentage of samples correctly classified using the handheld MEMS-NIRS device, by different data pretreatments. A) No scatter correction (None); B) Multiplicative Scatter Correction (MSC); C) Standard Normal Variate followed of Detrending (SNV + DT). ▲ Cross-validation; ■ Validation.

Table 1 Classification results obtained by PLS2.

Analysis mode/ Instrument	Pretreatment	Origin	Classified as (%)					
			Acorn		Feed		Recebo	
			CVal.	Val.	CVal.	Val.	CVal.	Val.
Intact carcass fat/MEMS	1600– 2208 nm –8 nm	Acorn	92.2	93.9	0	0	23.1	27.3
		Feed	0	4.3	98.2	96.4	6.1	12.1
		Recebo	23.1	6.1	1.8	3.6	70.8	60.6
Skin-free intact fat/FNS	450– 2208 nm 2 nm MSC	Acorn	78.1	90.9	0	0	15.4	12.1
		Feed	0	0	92.9	96.4	3.1	0
		Recebo	21.9	1.0	7.1	3.6	81.5	87.9
Skin-free intact fat/FNS	1100– 2208 nm 2 nm MSC	Acorn	76.6	87.9	0	0	29.2	15.1
		Feed	0	0	98.2	89.3	9.2	6.1
		Recebo	23.4	12.1	1.8	10.7	61.6	78.8
Melted fat/FNS	450– 2500 nm 2 nm None	Acorn	100	96.9	0	0	3.1	0
		Feed	0	0	100	96.4	0	0
		Recebo	0	3.1	0	3.6	96.9	100
Melted fat/FNS	1100– 2500 nm 2 nm None	Acorn	96.9	96.9	0	3.6	10.8	9.1
		Feed	0	0	100	96.4	0	0
		Recebo	3.1	3.1	0	0	89.2	90.9

CVal.: cross-validation; Val.: validation.

Bold numbers indicate the best classification models for each analysis mode.

“Recebo”. When the 1100–2500 nm wavelength range was used rather than the full instrumental range, the percentage of correctly-classified “Acorn” and “Feed” samples were identical and “Recebo” samples decreased. This may again be due to the removal of useful spectral information, especially relevant to discriminate “Recebo” samples. A comparison of this instrument/analysis mode versus the fresh intact fat analysis in the carcass with the MEMS-NIRS instrument showed a reduction with this last instrument in the percentage of samples correctly classified of 3.0% in the “Acorn” group and 59.4% for the “Recebo” group. Similar reasons to those above for the comparison with the FNS intact fat analysis could influence the results, plus the fact that the melted fat spectra had better defined peaks with no water interference.

The predictive capacity of the model constructed using the handheld MEMS instrument would appear very satisfactory, correct-classification percentages being comparable to those obtained using the monochromator. Moreover, it offers clear practical advantages for the in-situ analysis of subcutaneous fat in the carcass. Nevertheless, NIRS applications in agro-food products heavily rely on the product variability represented in the library. In the present case, at least 4 years or slaughter seasons should be analyzed to include enough variability for robust model development.

This portable, robust, low-cost instrument can provide direct measurements in carcass backfat, displaying results on a screen; this enables fast, non-destructive and individual analysis of each animal. The use of this instrument may have a major impact on quality control, traceability and authentication of Iberian pork products. This will evidently benefit the industry: the livestock farmer can be paid by animal, with the premium appropriate to the commercial category, rather than by batches, and the final destination of each carcass can be decided in real-time at the slaughter-house. From a marketing and consumer point of view, the identification and traceability of each individual carcass contribute to the image of a safe, carefully-controlled product and thus to increased consumer satisfaction.

3.3.2. Comparison of MEMS and monochromator instruments

Though the above results indicate that the performance of the handheld MEMS instrument for categorizing IP carcasses by feeding regime is comparable to that of the high-resolution monochromator (FNS), it would be useful to determine to what extent inter-instrument variations in classification are attributable to different optic designs, spectral ranges and/or different resolutions/intervals. As indicated earlier, a piecewise cubic interpolation algorithm was used for wavelength resolution adjustment between instruments.

The best discrimination results using melted fat and skin-free intact backfat samples analyzed on the FNS, obtained at an initial resolution of 2 nm and with the reduced wavelength range of 1600–2208 nm used in the MEMS instrument (a non-contact step of around 8 nm), are shown in Table 2. Validation results indicated that, generally, any reduction in the wavelength range, regardless of wavelength interval, strongly influenced the percentage of correctly-classified samples, which decreased independently of the instrument and analysis mode; especially for the “Recebo” group (cf. Table 1).

Using the FNS monochromator in the 1600–2208 nm range (Table 2) rather than the full 450–2500 nm range (Table 1), at the same resolution (2 nm) and for melted fat samples, the number of misclassified “Recebo” samples in the validation set rose by 6.1% and by 6% for “Acorn”. Reducing the wavelength range clearly affects the classification of “Recebo” samples because certain relevant peaks are missing in the reduced range. Reduction in wavelength interval (from 2 nm to a non-constant step of 8 nm) caused a 18.2% increase plus the above loss of predictive ability in the number of misclassified “Recebo” melted fat samples and 6.1% for the “Acorn” group, indicating the extent to which wavelength interval, too, influences sample classification.

Table 2

Percentage of samples correctly classified depending on the analysis mode, instrument and wavelength interval in the 1600–2208 nm range.

Analysis mode/ Instrument	Wavelength interval/ Pretreatment	Category	Samples correctly classified (%)	
			Cross-validation	Validation
Intact carcass fat/MEMS	~8 nm	Acorn	92.2	93.9
	None	Feed	98.2	96.4
	2,5,5,1 6 PLS factors	Recebo	70.8	60.6
Skin-free intact fat/FNS	2 nm	Acorn	68.8	93.9
	None	Feed	98.2	92.8
	2,10,5,1 5 PLS factors	Recebo	67.7	66.6
Skin-free intact fat/FNS	~8 nm ^a	Acorn	70.3	87.9
	None	Feed	94.6	92.8
	2,5,5,1 5 PLS factors	Recebo	66.1	69.7
Melted fat/FNS	2 nm	Acorn	92.2	90.9
	SNV + DT	Feed	100	96.4
	1,5,5,1 5 PLS factors	Recebo	89.2	93.9
Melted fat/FNS	~8 nm ^a	Acorn	84.4	84.8
	SNV + DT	Feed	96.4	96.4
	2,5,5,1 5 PLS factors	Recebo	73.8	75.7

^a Interpolated spectra from FNS spectral resolution to MEMS-NIRS instrument resolution using the shape preserving piecewise cubic function.

Using the FNS instrument for the analysis of skin-free intact fat samples, reduction of the wavelength range at the same resolution prompted a decrease in the number of correctly-classified by 3.6% and 21.3% in the “Feed” and “Recebo” categories, respectively. Moreover, reduction of the spectral resolution reduced the number of correctly-classified “Acorn” samples from 90.9% (450–2500 nm with an interval of 2 nm) to 93.9% (1600–2208 nm with an interval of 2 nm) and to 87.9% (1600–2400 nm with a non-constant step of 8 nm) for the validation set. In general terms, therefore, reduction of the spectral range and wavelength interval leads to increased misclassification, due to the loss of relevant information. Similar results were observed for both analysis modes when using the wavelength ranges 450–2500 nm and 1100–2500 nm (melted fat) and using the range 450–2208 nm and 1100–2208 nm for intact adipose tissue. The use of at least the full NIR region (725–2500 nm) with a small spectral interval is therefore recommended wherever possible. Obviously, this is a decision that instrument developers should take into account within affordable accuracy classification and price for the industry.

Comparison of the predictive ability of the monochromator and MEMS-based instruments for the same presentation mode (intact fat) and spectra conditions (same range and wavelength interval) indicated that the latter performed better for classification of the two extreme commercial categories (Table 2), while there was little difference between the two for “Recebo” samples. This may mean that, though both instruments were working in the same wavelength range, certain differences in instrument design in this case generally favor the handheld instrument. The optical design of the new handheld MEMS instruments is substantially more advanced than that of the older FNS monochromators.

4. Conclusions

The handheld MEMS-NIRS device used in the slaughterhouse successfully classified Iberian pig carcasses into three commercial categories by feeding regime. This device offers certain advantages over the at-line high-resolution monochromators, chief among which are its ease of use and portability. The portable MEMS-NIRS instrument enables the individual in-situ inspection of every single incoming carcass. This is crucial, since not all the animals belonging to a given

batch, though reared under the same conditions, will necessarily meet the standards for a specific commercial category. The results obtained here should help instrument developers to consider different optimizations for this particular application, especially in terms of wavelength range, spectral resolution and sampling area. The MEMS-based spectrometers currently marketed are all of the same design; new designs are recommended for use in the Iberian pork industry and throughout the meat sector.

Acknowledgments

This work was financed by the Research Project INIA "RTA 2008-00026-C07" and the Research Excellence Program of the Andalusian Regional Government (Project no. P09-AGR-5129). The authors are grateful to the Protected Designation of Origin Los Pedroches and to the Iberian pork industries COVAP S.C.A., Embutidos Camilo Ríos S.L. and Sierra de Sevilla for providing experimental materials. Thanks are also given to Antonio López-López, Manuel Sánchez-Calderón and María del Carmen Fernández-Fernández for their technical assistance. EZR acknowledges the financial support of the Spanish Ministry of Education as a fellow of the Program "Training of University Teachers" (Formación del Profesorado Universitario, FPU. AP2008-00838).

References

- Arce, L., Domínguez-Vidal, A., Rodríguez-Estévez, V., López-Vidal, S., Ayora-Cañada, M.J., & Valcárcel, M. (2009). Feasibility study on the use of infrared spectroscopy for the direct authentication of Iberian pig fattening diet. *Analytical Chemical Acta*, 636, 183–189.
- Barnes, R. J., Dhanoa, M. S., & Lister, S. J. (1989). Standard normal variate transformation and detrending of near infrared diffuse reflectance spectra. *Applied Spectroscopy*, 43, 772–777.
- BOE (2007). *Real Decreto 1469/2007, de 2 de noviembre, por el que se aprueba la norma de calidad para la carne, el jamón, la paleta y la caña de lomo ibéricos*.
- Bonneau, M., & Lebret, B. (2010). Production systems and influence on eating quality of pork. *Meat Science*, 84, 293–300.
- Carraspiro, A. I., Bonilla, F., & García, C. (2003). Effect of crossbreeding and rearing system on sensory characteristics of Iberian ham. *Meat Science*, 65, 623–629.
- Cava, R., Ventanas, J., Ruiz, J., Andrés, A. I., & Antequera, T. (2000). Sensory characteristics of Iberian ham: Influence of rearing system and muscle location. *Food Science and Technology International*, 6, 235–242.
- Croccombe, R. (2004). MEMS technology moves process spectroscopy into a new dimension. *Spectroscopy Europe*, 16–19.
- Day, D. R., Butler, M. A., Smith, M. C., McAllister, A., Deutsch, E. R., Zafriou, K., et al. (2005). Diffraction-MEMS implementation of a hadamard near-infrared spectrometer. *TRANSDUCERS'05. The 13th international conference on solid-state sensors, Actuators and Microsystems*, vol. 2. (pp. 1246–1249). Piscataway, NJ, USA: Institute of Electrical and Electronics Engineer (IEEE) [Seoul, Korea].
- Daza, A., Mateos, A., López-Carrasco, C., Rey, A., Ovejero, I., & López-Bote, C. J. (2006a). Effect of feeding system on the growth and carcass characteristics of Iberian pigs, and the use of ultrasound to estimate yields of joints. *Meat Science*, 72, 1–8.
- Daza, A., Olivares, A., Rey, A. I., Ruiz, J., & López-Bote, C. (2006b). Iberian pig production: The problems of success. *Options Méditerranéennes*, 78, 163–171.
- Daza, A., Ruiz-Carrascal, J., Olivares, A., Menoyo, D., & López-Bote, C. (2007). Fatty acid profile of the subcutaneous backfat layers from Iberian pigs raised under free-range conditions. *Food Science and Technology International*, 13(2), 135–140.
- De Pedro, E., Casillas, M., & Miranda, M. (1997). Microwave oven application in the extraction of fat from the subcutaneous tissue of Iberian pig ham. *Meat Science*, 45(1), 45–51.
- De Pedro, E., Garrido, A., Bares, I., Casillas, M., & Murray, I. (1992). Application of near infrared spectroscopy for quality control of Iberian pork industry. In K. I. Hildrum, R. Isaksson, T. Naes, & A. Tandberg (Eds.), *Near infrared spectroscopy bridging the gap between data analysis and NIR applications* (pp. 345–348). UK: Ellis Horwood.
- De Pedro, E., Garrido, A., Lobo, A., Dardenne, P., & Murray, I. (1995). Objective classification of Iberian pig carcasses: GC versus NIR. In G. D. Batten, P. C. Flinn, L. A. Welsh, & A. B. Blakeney (Eds.), *Leaping ahead with near infrared spectroscopy* (pp. 291–295). Melbourne, Australia: NIR Spectroscopy Group. Royal Australian Chemistry Institute.
- Downey, G. (2000). Discrimination and authentication des aliments et des ingrédients alimentaires par spectroscopie dans l'infrarouge proche, et moyen. In D. Bertrand, & E. Dufour (Eds.), *La Spectroscopie Infrarouge et ses Applications Analytiques. Technique & Documentation* (pp. 397–422). Paris, France: Editions TEC&DOC.
- Fernández-Cábanas, V. M., Garrido-Varo, A., García-Olmo, J., De Pedro-Sanz, E., & Dardenne, P. (2007). Optimisation of the spectral pre-treatments used for Iberian pig fat NIR calibrations. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 87, 104–112.
- Fernández-Pierna, J. A., Vermeulen, P., Lecler, B., Baeten, V., & Dardenne, P. (2010). Calibration transfer from dispersive instruments to handheld spectrometers. *Applied Spectroscopy*, 64(6), 644–648.
- García-Olmo, J. (2002). *Clasificación y autenticación de canales de cerdo Ibérico mediante espectroscopía en el infrarrojo cercano (NIRS)*. PhD Thesis. University of Córdoba.
- García-Olmo, J., Garrido, A., & De Pedro, E. (1998). Methodological aspects on near infrared analysis of Iberian pig fat using intercalance-reflectance fiber optic mode. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 6, A307–A312.
- García-Olmo, J., Garrido-Varo, A., & De Pedro, E. (2001). The transfer of fatty acid calibration equations using one set of unsealed liquid standardisation samples. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 9, 49–62.
- García-Olmo, J., Garrido-Varo, A., & De Pedro, E. (2009). Classification of real farm conditions Iberian pigs according to regime with multivariate models developed by using fatty acids composition or NIR spectral data. *Grasas y Aceites*, 60(3), 233–237.
- Garrido, A., & De Pedro, E. (2007). The role of near infrared spectroscopy in verifying label information in agro-forestry. In D. A. Burns, & E. W. Ciurczak (Eds.), *Handbook of near-infrared spectroscopy analysis. Practical spectroscopy series* (pp. 387–398). USA: CRC Press [Ciurczak].
- Garrido-Varo, A., García-Olmo, J., & Pérez-Marín, M. D. (2004). Analysis of fats and oils. In C. Roberts, J. Workman, & J. Reeves (Eds.), *Near-infrared spectroscopy in agriculture* (pp. 487–558). Madison, WI, USA: Agronomy, Crop Science and Soil Science Societies of America.
- González-Martín, I., González-Pérez, C., Hernández-Méndez, J., & Álvarez-García, N. (2003). Determination of fatty acids in the subcutaneous fat of Iberian breed swine by near infrared spectroscopy (NIRS) with a fibre-optic probe. *Meat Science*, 65, 713–719.
- Hervás, C., Garrido, A., Lucena, B., García, N., & De Pedro, E. (1994). Near infrared spectroscopy of Iberian pig carcasses using an artificial neural network. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 2, 177–184.
- ISI (2000). *The complete software solution using a single screen for routine analysis, robust calibrations and networking*. USA: Infrasoft International Sylver Spring MD.
- Martínez, M. L., Garrido, A., De Pedro, E. J., & Sánchez, L. (1998). Effect of sample heterogeneity on NIR meat analysis: The use of the RMS statistic. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 6, 313–320.
- Naes, T., Isaksson, T., Fearn, T., & Davies, T. (2002). *A user-friendly guide to multivariate calibration and classification* (pp. 420). Chichester, UK: NIR publications.
- Osborne, B. G., Fearn, T., & Hindle, P. H. (1993). *Practical NIR spectroscopy with applications in food and beverage analysis*. In B. G. Osborne, T. Fearn, & P. H. Hindle (Eds.), *Food and beverage analysis* (pp. 11–35). Essex: Longman.
- Pérez-Marín, D., De Pedro, E., Guerrero-Ginel, J. E., & Garrido-Varo, A. (2009). A feasibility study on the use of near-infrared spectroscopy for prediction of the fatty acid profile in live Iberian pigs and carcasses. *Meat Science*, 83, 627–633.
- Pérez-Marín, D., Garrido-Varo, A., De Pedro, E., & Guerrero-Ginel, J. E. (2007). Chemometric utilities to achieve robustness in liquid NIRS calibrations: Application to pig fat analysis. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 87, 241–246.
- Pérez-Serrano, M. (2008). *A study of factors that influence growth performance and carcass and meat quality of Iberian pigs reared under intensive management systems*. PhD Thesis. Technical University of Madrid.
- Petrón, M. J., Muriel, E., Timón, M. L., Martín, L., & Antequera, T. (2004). Fatty acids and triacylglycerols profiles from different types of Iberian dry-cured hams. *Meat Science*, 68, 71–77.
- Prevolnik, M., Candek-Potokar, M., & Skorjanc, D. (2004). Ability of NIR spectroscopy to predict meat chemical composition and quality – A review. *Czech Journal of Animal Science*, 49(11), 500–510.
- Prieto, N., Roehle, R., Lavín, P., Batten, G., & Andrés, S. (2009). Application of near infrared reflectance spectroscopy to predict meat and meat products quality: A review. *Meat Science*, 83, 175–186.
- Sánchez, M. T., Flores-Rojas, K., Guerrero, J. E., Garrido-Varo, A., & Pérez-Marín, D. (2010). Measurement of pesticide residues in peppers by near-infrared reflectance spectroscopy. *Pest Management Science*, 66, 580–586.
- Shenk, J. S., & Westerhaus, M. O. (1991). Population structuring of near infrared spectra and modified partial least squares regression. *Crop Science*, 31, 1548–1555.
- Shenk, J. S., & Westerhaus, M. O. (1995). *Analysis of agriculture and food products by near infrared reflectance spectroscopy*. : Monograph, NIRSystems.
- Shenk, J. S., & Westerhaus, M. O. (1996). Calibration the ISI way. In A. M. C. Davies, & P. C. Williams (Eds.), *Near infrared spectroscopy: The future waves* (pp. 198–202). Chichester. UK: NIR Publications.
- Tejeras, D., García-Torres, S., Cabeza deVaca, M., Vázquez, F. M., & Cava, R. (2011). Acorns (*Quercus rotundifolia* Lam.) and grass as natural sources of antioxidants and fatty acids in the montanera feeding of Iberian pig: Intra and inter annual variations. *Food Chemistry*, 124, 997–1004.
- Ventanas, S., Ruiz, J., García, C., & Ventanas, J. (2007). Preference and juiciness of Iberian dry-cured loin as affected by intramuscular fat content, crossbreeding and rearing system. *Meat Science*, 77, 324–330.
- Weeranantapanan, J., Downey, G., Allen, P., & Sun, D. W. (2011). A review of near infrared spectroscopy in muscle food analysis: 2005–2010. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 19, 61–104.
- Williams, P. C., & Norris, K. H. (Eds.). (1987). *Near-infrared technology in the agricultural and food industries*. St. Paul, MN, USA: American Association of Cereal Chemists.
- Wolffenbuttel, R. F. (2005). MEMS-based optical mini- and microspectrometers for the visible and infrared spectral range. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 15, S145–S152.



EVALUACIÓN DE DISTINTOS ALGORITMOS CUALITATIVOS PARA LA CLASIFICACIÓN *IN SITU* DE CANALES DE CERDOS IBÉRICOS EN FUNCIÓN DE SU RÉGIMEN ALIMENTICIO

5.3.2. Evaluación de distintos algoritmos cualitativos para la clasificación *in situ* de canales de cerdos ibéricos en función de su régimen alimenticio

Introducción

El potencial de sensores MEMS-NIRS para la clasificación *in situ* de canales de cerdo ibérico en la línea de faenado, según régimen alimenticio, ha sido demostrado en el estudio anterior (sección 5.3.1). Estos equipos cuentan con un software, denominado Polychromix Method GeneratorTM, con diversas limitaciones para el tratamiento de datos espectrales, ya que sólo cuenta con el algoritmo PCA y PLS para el desarrollo de modelos. Concretamente, en relación al análisis cualitativo, dicho software sólo dispone de funciones para delimitar regiones en el espacio definido por las PCs, aspecto muy limitado para este tipo de aplicaciones.

Como se ha expuesto en la revisión bibliográfica (sección 3.3.4.5) existen multitud de algoritmos multivariantes cualitativos, muchos de ellos disponibles en distintos software, a partir de los cuales se pueden generar programas propios de análisis de datos espectrales. Buscando dar una solución práctica al hecho de que el instrumento MEMS-NIRS carece de un software propio de análisis cualitativo robusto, en este estudio se evalúa el desarrollo de distintos modelos de clasificación de canales de cerdo ibérico según régimen alimenticio, analizadas *in situ* en la línea de faenado con un equipo MEMS-NIRS, en base a los algoritmos supervisados SIMCA y PLS-DA, y no supervisados como KNN, que se encuentran entre los de más amplio uso en el tratamiento multivariante de datos NIRS para aplicaciones cualitativas. Las categorías empleadas en el desarrollo de dichos modelos se han basado en las actuales categorías comerciales vigentes en el sector (“bellota”, “cebo” y “recebo”), aunque debido a los frecuentes cambios de Norma de Calidad que se producen y, asimismo, de denominaciones comerciales, también se ha optado por sólo las dos categorías extremas (“bellota” y “cebo”).

Material y métodos

Un total de 584 canales de cerdo ibérico, de distintos regímenes alimenticios y campañas (Tabla 5.3.2.1), han sido analizadas *in situ* al final de la línea de faenado con un equipo NIRS portátil diseñado con tecnología basada en sistemas micro-electro-mecánicos (MEMS) (PhazirTM 1624, Polychromix Inc., Wilmington, MA, USA), que trabaja en modo reflectancia en el rango espectral 1.600 – 2.400 nm con un intervalo no constante entre longitudes de onda de aproximadamente 8 nm. En este caso, el procedimiento de recogida de espectros es igual que el descrito en el artículo de la sección 5.3.1.

Tabla 5.3.2.1. Distribución del número de canales analizadas *in situ* con un equipo MEMS-NIRS portátil según régimen alimenticio y campaña de sacrificio.

Campaña	Régimen alimenticio		
	Bellota	Cebo	Recebo
2008-2009	49	58	38
2009-2010	136	150	153
Total	185	208	191

El análisis de datos se realizó siguiendo el material y métodos descrito en la sección 5.3.1, que en resumen consta de un análisis de la repetibilidad espectral mediante el algoritmo RMS, un análisis PCA para la detección de muestras espectralmente anómalas y selección de una de cada cinco muestras en base a la ordenación llevada a cabo con el algoritmo CENTER (Shenk y Weterhaus, 1991b) para crear el colectivo de validación; el resto formaron parte del colectivo de calibración o entrenamiento para el desarrollo de los modelos predictivos cualitativos.

Se han evaluado tres algoritmos multivariantes de clasificación: PLS-DA (*Partial Least Square- Discriminant Analysis*), SIMCA (*Soft Independent Modelling Class Analysis*) y KNN (*K-Nearest Neighbour*). Una amplia descripción de estos algoritmos se puede encontrar en el apartado 3.3.4.5 de la revisión bibliográfica. No obstante, a continuación se realiza una síntesis de los mismos. El primero de ellos se basa en clasificar las muestras en cada grupo en base a un modelo de regresión calculado para maximizar la covarianza entre las variables con respecto a los otros grupos e ignorar la varianza dentro de una clase. SIMCA es un algoritmo de reconocimiento de patrones supervisado que desarrolla un modelo PCA para cada una de las clases, en el que se proyecta la muestra a predecir y, en función, de la distancia de la muestra dentro de cada modelo PCA se asigna una clase. Por otra parte, KNN es un algoritmo no supervisado que identifica las K muestras más similares, en el colectivo de calibración, a la muestra a predecir. De este modo, los valores de referencia de esas muestras seleccionadas tienen un peso en función de la distancia a la muestra a predecir para determinar la clase a la que pertenece. Estos algoritmos fueron evaluados utilizando MATLAB[®] (ver 7.10, The Mathworks Inc., MA, USA) con las funciones del paquete estadístico PLS Toolbox (ver 5.8, Eigenvector Research Inc., WS, USA). El número de factores en los modelos, ya sea de regresión (caso de los basados en el algoritmo PLS) o PCA, es un factor crítico que puede influir en los resultados. Para ello, se utilizaron cuatro grupos de validación cruzada. En todos los casos, fueron evaluados distintos pretratamientos de la señal espectral: no corrección de la dispersión (*None*), Variable Normal Estándar (SNV, *Standard Normal Variate*) más Detrending (DT, *Detrending*), o Corrección Multiplicativa de la Dispersión (MSC, *Multiplicative Scatter Correction*);

ambos seguidos de un tratamiento derivativo (primera o segunda derivada). En nuestro caso, el algoritmo de Savitzky-Golay fue utilizado para suavizar y derivar los espectros con un tamaño de ventana de 5 variables. Finalmente, los datos fueron centrados.

Los distintos modelos fueron evaluados mediante el cálculo de la proporción de muestras correctamente clasificadas en cada una de las categorías. Los mejores modelos fueron considerados aquellos con el menor número de muestras incorrectamente clasificadas para el colectivo de validación.

Resultados

Un total de 174 canales de “bellota”, 190 de “cebo” y 175 de “recebo” fueron empleadas en el desarrollo y evaluación de los modelos cualitativos. Tras ser ordenadas en función de la distancia GH, de forma independiente para cada categoría, una de cada cinco muestras fue seleccionada para el colectivo de validación. Por lo tanto, el colectivo de calibración quedó configurado por 139 canales de “bellota”, 152 de “cebo” y 140 de “recebo”; mientras el de validación fue de 35, 38 y 35, respectivamente para cada categoría.

La Tabla 5.3.2.2 muestra los mejores modelos obtenidos al evaluar el colectivo de validación con los distintos algoritmos de clasificación para las tres categorías propuestas, en base a la legislación actualmente vigente. En general, se observa, al igual que se obtuvo en los resultados mostrados en la sección 5.3.1, que no realizar un pretratamiento de la dispersión proporciona los mejores modelos para el análisis cualitativo de canales de cerdo ibérico con equipos MEMS-NIRS. Todos los algoritmos permiten clasificar correctamente entorno al 90 % de las canales, según su régimen alimenticio, para las categorías extremas (“bellota” y “cebo”). No obstante, el algoritmo SIMCA muestra unos ligeros porcentajes superiores de canales correctamente clasificadas para estas dos categorías. En cuanto a la clasificación de las canales de la categoría “recebo”, se observa que es la más compleja de clasificar al presentar porcentajes de muestras correctamente clasificadas entre 74 y 82 %, según el algoritmo evaluado.

Aunque el número de muestras evaluadas en este estudio no se corresponde con el colectivo de muestras del artículo 5.3.1, donde se demuestra el potencial del análisis *in situ* con equipos portátiles MEMS-NIRS para la autenticación de canales de cerdo ibérico según régimen alimenticio, los resultados de ambos están en consonancia. Los resultados de canales correctamente clasificadas en ambos estudios son muy similares para las tres categorías comerciales consideradas, siendo el “recebo” el grupo que presenta un porcentaje de muestras correctamente clasificadas inferior. Mientras que en la sección 5.3.1 se utilizó el algoritmo ISI PLS2, incorporado en un software patentado, en este estudio el algoritmo SIMCA, disponible para su libre uso, e incorporación de rutina propias de análisis de datos espectroscópicos, es aquel

que produce mayores porcentajes de muestras correctamente clasificadas, tanto individualmente para cada categoría como considerando el porcentaje total de muestras correctamente clasificadas, muestra (Tabla 5.3.2.2).

Tabla 5.3.2.2. Resultados de clasificación, según régimen alimenticio, obtenidos con distintos algoritmos multivariantes para el análisis *in situ* de tejido adiposo subcutáneo en la canal de cerdo ibérico.

Algoritmo	Pretratamiento	Origen	Clasificado como (%)			Total* (%)
			Bellota	Cebo	Recebo	
SIMCA	<i>None</i> + 1 st der. + centrado	Bellota	91,43	5,71	2,86	89
		Cebo	2,63	94,74	2,63	
		Recebo	5,71	11,43	82,86	
PLS-DA	<i>None</i> + 1 st der. + centrado	Bellota	88,57	5,71	5,71	87
		Cebo	2,63	94,74	2,63	
		Recebo	11,43	11,43	77,14	
KNN	<i>None</i> + 1 st der. + centrado 1 K muestras	Bellota	91,43	2,86	5,71	82
		Cebo	7,89	81,58	10,53	
		Recebo	11,43	14,29	74,29	

Todos los modelos han sido desarrollados en el rango 1.600-2.208 nm.

Para cada algoritmo se muestra la mejor combinación de pretratamiento espectral, destacándose en negrita el mejor de todos ellos.

*Porcentaje global de muestras correctamente clasificadas.

La Tabla 5.3.2.3 muestra los mejores modelos obtenidos al evaluar el colectivo de validación con los distintos algoritmos de clasificación considerando solamente las dos categorías extremas. Esto quiere decir, que los animales de la categoría “recebo” fueron eliminados del colectivo de calibración y no se consideraron en el desarrollo de los modelos de clasificación. Los resultados indican que todos los algoritmos, tanto supervisados como no supervisados, clasifican correctamente de forma global el 96 % de las muestras pertenecientes a las categorías de “bellota” y “cebo”. Como se ha puesto de manifiesto en el artículo 5.3.2 (Tabla 1), estos resultados confirman el potencial, viabilidad y capacidad predictiva del análisis NIRS *in situ* y no destructivo en la línea de faenado con equipos portátiles basados en sistemas micro-electro-mecánicos.

Posteriormente, y dada la existencia de los animales de la categoría “recebo” en la legislación vigente a fecha de este estudio como la propuesta que tiene el MAGRAMA de agrupar esta categoría junto con la actual “cebo de campo” para la futura Norma de Calidad y futuros cambios en la misma, se ha considerado conveniente el aplicar los modelos generados con las dos categorías extremas (Tabla 5.3.2.3) a los espectros de las canales clasificadas por inspección de campo como “recebo” (colectivo validación). Idealmente, los cerdos de “recebo” deberían ser clasificados en la categoría de inferior calidad (“cebo”), aunque es cierto que por el régimen alimenticio de los animales hay individuos que pueden tener unas características más similares a animales de la categoría “bellota”. Los algoritmos SIMCA y KNN clasifican

un 60 % de los individuos del colectivo de validación (35 animales de “recebo”) dentro de la categoría “cebo”, mientras PLS-DA clasifica solamente el 48 % de ellos dentro de esta categoría.

Tabla 5.3.2.3. Resultados de clasificación, según régimen alimenticio y considerando sólo “bellota” y “cebo”, obtenidos con distintos algoritmos multivariantes para el análisis *in situ* de tejido adiposo subcutáneo en la canal de cerdo ibérico.

Algoritmo	Pretratamiento	Origen	Clasificado como (%)		Total (%) [*]
			Bellota	Cebo	
SIMCA	<i>None</i> + 1 ^a der. + centrado	Bellota	94,29	5,71	96
		Cebo	2,63	97,37	
PLS-DA	<i>None</i> + 1 ^a der. + centrado	Bellota	97,14	2,86	97
		Cebo	2,63	97,37	
KNN	<i>None</i> + 1 ^a der. + centrado 10 K muestras	Bellota	100,00	0,00	96
		Cebo	7,89	92,11	

Todos los modelos han sido desarrollados en el rango 1.600-2.208 nm.

Para cada algoritmo se muestra la mejor combinación de pretratamiento espectral, destacándose en negrita el mejor de todos ellos.

^{*}Porcentaje global de muestras correctamente clasificadas.

A tenor de los resultados de este estudio, el algoritmo SIMCA es el que resultados más robustos y exactos muestra frente a los otros algoritmos cualitativos evaluados.

Conclusiones

En base a los resultados obtenidos, el equipo portátil MEMS-NIRS evaluado en este trabajo permite realizar un análisis *in situ* individual, en la línea de faenado, de canales de cerdos ibéricos en condiciones reales de la industria de transformación de este sector. El algoritmo SIMCA clasifica con un porcentaje global de acierto de entorno al 89 % canales de cerdo ibérico en función del régimen alimenticio realizado por los animales durante los dos últimos meses previos al sacrificio (“bellota”, “recebo” y “cebo”). Además, este algoritmo, considerando únicamente las categorías extremas (“bellota” y “cebo”), clasifica correctamente el 94 % y 97 % de las canales analizadas, respectivamente para cada grupo, y de forma global el 96 % de los individuos analizados. Esto subraya que la utilización del algoritmo SIMCA para el análisis de datos espectroscópicos procedentes del análisis *in situ* de canales de cerdos ibéricos con equipos portátiles MEMS-NIRS en la línea de faenado es una de las mejores opciones para diseñar un sistema de control de calidad basado en esta tecnología.

5.3.2. Prediction of fatty acids content in pig adipose tissue by near infrared spectroscopy: at-line versus *in-situ* analysis

Zamora-Rojas E.*, Garrido-Varo A., De Pedro-Sanz E., Guerrero-Ginel J.E. and Pérez-Marín D.

Department of Animal Production, Non-Destructive Spectral Sensor Unit, Faculty of Agricultural and Forestry Engineering, University of Córdoba, Agrifood Campus of International Excellence (ceiA3), Campus Rabanales, N-IV, km 396, Córdoba, 14014, Spain.

* Corresponding author: Tel. +34 957 21 85 55; fax. +34 957 21 85 55; e-mail. e.zamora@uco.es; address: Campus Rabanales, N-IV, km 396, 14014, Córdoba, Spain.

Abstract

A handheld micro-electro-mechanical system (MEMS) based spectrometer working in the near infrared region (NIR) (1600-2400 nm) is evaluated for *in-situ* and non-destructive prediction of main fatty acids in iberian pig (IP) carcasses. 110 IP carcasses were measured. Performance of the instrument was compared with at-line high-resolution NIRS monochromators working in two analysis modes: melted fat samples (transflectance cups) and intact adipose tissues (interactance fiber optic). Standard Error of Prediction (SEP) values obtained on the MEMS-NIRS device were: 0.68 % (stearic), 1.30 % (oleic), 0.55 % (linoleic) and 1% (palmitic), explaining a variability of 83 %, 84 %, 81 % and 78 %, respectively. As expected, this represented a loss of predictive capability in comparison to at-line models, even with the same spectral characteristics as on the handheld device. However, the estimated total errors were in the same level for gas chromatography and NIRS analysis. This indicates that the MEMS-NIRS *in-situ* analysis of each individual carcass provides a cost-effective and real-time quality control system with a suitable accuracy.

Keywords: Iberian pig; at-line analysis; *in-situ* analysis; NIRS; quantitative; fatty acids; MEMS device.

1. Introduction

The determination of the fatty acid (FA) profile has a high relevance for the quality control of raw or/and dry-cured iberian pig (IP) meat products. FA profile of the subcutaneous adipose tissue performed by gas chromatography (GC) has been traditionally used for classifying or/and authenticating animals in different commercial categories. Furthermore, nowadays, due to the consumers demands and legal requirements (EU, 2011), the information displayed in the food labelling for local, traditional and added value meat products, as the case of IP, is very important. Mandatory and voluntary food traceability and labeling programs is, therefore, crucial to inform consumers and get a differentiated position on the market from other similar products since this compositional information can be used for marketing strategies related to nutritional and health aspects (Garrido & De Pedro, 2007).

Near Infrared Reflectance Spectroscopy (NIRS) has shown its potential for predicting FA composition in IP melted fats, adipose and meat tissues with a variable grade of precision and accuracy ([De Pedro et al., 1992], [García-Olmo et al., 2001], [González-Martín et al., 2002, 2003, 2005], [Fernández et al., 2003] [Fernández-Cabanás et al., 2007, 2011] and [Pérez-Marín et al., 2007, 2009, 2010]). Garrido et al. (2004) indicated that the differences found in the estimation of the main fatty acids and its overall statistic performance depends on the sample presentation, analysis mode and instrument characteristics. NIRS can enable a fast, environmentally friendly, objective, cost-efficient analysis, although it requires a calibration stage based on well-known samples analyzed both spectrally and by wet chemistry (i.e. GC as reference analysis). In fact, the melted fat analysis by NIRS has demonstrated to be useful as a substitute of GC analysis, considering the errors associated, to predict the main fatty acid composition, specially, stearic acid (C18:0), oleic acid (C18:1), linoleic acid (C18:2) and palmitic acid (C16:0) ([García-Olmo et al., 2001], [Garrido et al., 2004] and [Fernández-Cabanás et al., 2007]), although some cautions should be taken for routine analysis such as deviations due to large time elapse between calibration development and NIRS analysis of new unknown samples (Pérez-Marín et al., 2007, 2010). Moreover, the industry is interested in the simplification of the sampling/sample presentation to perform individual analysis at the speed of the slaughter process and in the use of new low-cost NIRS instrumentation. NIRS has been studied for these purposes based on fiber-optic instrumentations showing a suitable potential for the prediction of oleic, linoleic, palmitic and stearic fatty acids ([González-Martín et al., 2003], [Pérez-Marín et al., 2009] and [Pérez-Juan et al., 2010]). As in other food products, the variability between campaigns/seasons/years is a complex task that can affect the suitability of the technology. In extensive IP productions, it has been showed the lack of uniformity in the chemical composition between individual animals and different slaughtering campaigns

due probably to the variability in the diet based on natural resources of the field (Garrido et al., 2004; De Pedro et al., 2007; Tejerina et al., 2012).

A further step, instead to take the sample from the process and present it to the instrument, is to move the instrument to the process line, making a reality the non-destructive *in-situ* NIRS analysis. Preliminary work of the author's research team published the first on-site NIRS application for the prediction of FA profiles in the slaughter process line with a fiber optic post-dispersive spectro-radiometer (Pérez-Marín et al., 2009). They measured *in vivo* pig animals, subcutaneous adipose tissue in the carcasses at the carcass process line and in the laboratory for the prediction of FA profile. However, they concluded that the instrumentation used is not simple to adapt in the industry due to its weight and other portability characteristics.

New innovative handheld devices based on micro-electro-mechanical systems (MEMS) are now in the market, combining small size, light weight, robustness, cost-effectiveness and ease of use. Zamora-Rojas et al., (2012) showed the suitability of this kind of instrumentation for the *in-situ* classification/authentication of IP carcasses in different commercial categories based on the feeding regime of the animals during the two last months prior to slaughter. However, there is no information about its applicability for the prediction of FAs analysis. Moreover, all the studies performed using other instruments are difficult to compare since they used different sample sets showing independent results what it does not enable to know the effect of instrumentation and/or characteristics of the sample presentation/analysis mode in the predictive capacity of the models.

In this paper, different NIRS analysis modes and instrumentations are evaluated for the quantitative at-line and *in-situ* fatty acid profile prediction (C16:0, C18:0, C18:1 and C18:2) in IP subcutaneous adipose tissues using the same data set. The study compares the performance and accuracy of two NIRS at-line applications (melted fat and intact adipose tissue analysis) versus an *in-situ* application (non-destructive measurements of subcutaneous adipose tissue in the carcass) based on a handheld MEMS-NIRS device implemented in the carcass process line.

2. Materials and methods

2.1. Sample set

One hundred and ten iberian pigs (pure iberian and iberian-duroc crossbreds), from two slaughtering seasons (2008/2009 and 2009/2010) and different feeding regime backgrounds (“Acorn”, “*Recebo*” and “Feed”), as described in Spanish legislation (BOE, 2007) and monitored by trained personnel on the field, were slaughtered at several commercial Spanish slaughterhouses at the age of 12-14 months and with an average weight of 160 kg.

2.2. NIRS measurements and reference data

All samples were analyzed in three NIRS instruments:

- One handheld micro-electro-mechanical system (MEMS)-based NIR spectrometer (PhazirTM 1624, Polychromix Inc., USA) working in reflectance mode in the 1600-2400 nm range with a non-constant wavelength step of around 8 nm (pixel resolution 8 nm, optical resolution 12 nm). Sensor integration time was 600 ms. The device was equipped with quartz protection to prevent dirt accumulation. Transverse subcutaneous adipose tissue sections in the tail insertion area were measured directly on the carcasses around 2 hours post-slaughter, chilled in a temperature controlled chamber. Four spectra per carcass were collected over the sample area, two per hypodermis sub-layer (Figure 1) to cover the possible variability of the sample.

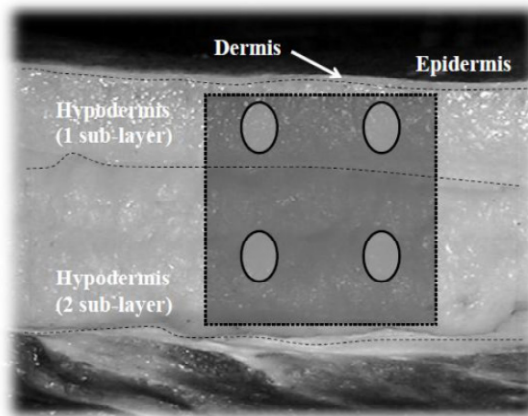


Figure 1. Schematic drawing of a subcutaneous adipose tissue section. Spot areas ($8 \times 10 \text{ mm}^2$) scanned by the MEMS-NIRS instrument (light grey) and area ($43 \times 43 \text{ mm}^2$) analyzed by the fiber optic of the FNS monochromator (dark grey).

- Two Foss NIRSystems (FNS) 6500 spectrometers (Foss-NIRSystems Inc., Sylver Spring, MD, USA), one equipped with an interactance fiber optic for intact analysis of subcutaneous adipose tissues and other with a spinning module for the analysis in transflectance mode of melted fat samples. The instruments operate in the spectral range 400-2500 nm with a spectral interval of 2 nm. Duplicate spectra were collected. Skin-free subcutaneous adipose tissue samples were obtained from the same area as the MEMS-NIRS measurements and stored at -20°C until 24 h before the at-line NIRS analysis. After intact measurements with the FNS instrument, the samples were melted in a microwave following De Pedro et al. (1997) procedure for its NIRS

analysis using folded-transmission gold reflector cups with a pathlength of 0.1 mm.

Gas chromatography (GC) was used to determine the fatty acid composition as reference method. The methyl esters of fatty acids were extracted with hexane using a PerkinElmer Sigma 3D chromatograph with FID detector and automatic injection system. Values are expressed as percentages (%) of the total FAs analyzed (BOE, 2004).

2.3. Data processing

Different software and chemometric packages were used for data processing. Spectra repeatability and population structuring analysis were performed using the WinISITM software package (ver 1.50, Infrasoft International, LLC., USA). Interpolation of the data between instruments was performed on MATLAB[®] (ver 7.10, The Mathworks, Inc., USA). Chemometric PLS Toolbox software for MATLAB[®] was used for calibration development and evaluation (ver 5.8, Eigenvector Research, Inc., USA).

The selection of the optimized wavelength range for each application is a critical point apart from the selection of the sample library, analysis performance, spectral repeatability, etc. Based on previous papers, the data matrices proceeding from the interactance FNS analysis of intact adipose tissue were trimmed to the range 450-2208 nm and from MEMS-NIRS reflectance carcass analysis to the region 1600-2208 nm (Zamora-Rojas et al., 2012) previously to any other data analysis. This was done to avoid noisy regions.

2.3.1 Spectral repeatability

The Root Mean Squared (RMS) statistic (Shenk & Westerhaus, 1995, 1996) was used for spectrum repeatability evaluation since the collection of high-quality spectra is a critical parameter for a reliable calibration model. This statistic indicates the similarity between different spectra of a single sample. RMS cut-off values used for spectral quality assurance were set to, based on previous findings: 4,000 $\mu\log(1/R)$ for melted fat samples in FNS transfectance analysis (450-2500 nm); 5,012 $\mu\log(1/R)$ for intact adipose tissue in FNS in the range 450-2208 nm and 43,000 $\mu\log(1/R)$ for the MEMS-NIRS instrument in the 1600-2208 nm range scanning in different points through the sampling area ([García-Olmo, 2002] and [Zamora-Rojas et al., 2012]).

Any replicate higher than the RMS cut-off values were repeated until values fell below those limits, thus ensuring a high degree of spectrum repeatability. In the case of the MEMS-NIRS device, any replicate above the limit was removed from the library since this analysis was performed once the carcasses were processed. The mean spectrum of the replicates of each samples were calculated for further analysis.

2.3.2. *Principal Component Analysis and detection of spectral outliers*

Spectral outlier detection was performed based on Global Mahalanobis (GH) distance analysis, i.e. mahalanobis distance between the center of the population and each sample in the space defined by a Principal Component Analysis (PCA) based on the spectra information. Samples with GH values larger than 3 were considered outliers (Shenk & Westerhaus, 1996). Spectral outlier detection was performed individually for each analysis mode/instrument considering the optimum spectral range for each one (i.e. 1600-2208 nm for the handheld MEMS-NIRS instrument, 780-2208 nm for intact analysis in FNS and 1100-2500 nm for the melted fat analysis in FNS). Then, all the spectra outliers, independently of the analysis mode, were removed in all the sets. So, the final number of samples used in the calibration and evaluation stage for each device was the same in order to perform instrument/analysis model comparison (Garrido et al., 2004).

Several spectra pre-treatments were evaluated: no scatter correction (None), Multiplicative Scatter Correction (MSC) (Geladi et al., 1985) and Standard Normal Variate (SNV) plus Detrending (DT) (Barnes et al., 1989). First (1,5,5,1) and second (2,5,5,1) derivatives were also evaluated, where the first digit is the order of the derivative, the second is the gap which the derivative is calculates, the third is the number of data points in a running average or smoothing and the fourth is the second smoothing.

2.3.3. *Quantitative models*

Once spectral outlier detection was performed, the final number of samples comprised 100 of the original 110 samples. Training and validation sets were selected based on the CENTER algorithm proposed by Shenk & Westerhaus (1991), available in the WinISITM software in the option “create score file from spectra file”. This algorithm performed a PCA to calculate the GH distances of each sample to the center of the population and it sorts the samples in decreasing order. One of every five samples was then selected to be part of the validation set (20 samples, minimum number of validation samples recommended by the ISO12099:2010). The remaining samples were part of the training set (80 samples). This selection was based on the MEMS-NIRS data set since had the shorter wavelength range and was more appropriate for *in-situ* application.

Partial Least Squares (PLS) regression ([Martens & Naes, 1985], [Wold et al., 2001]) was used for calibration development of the FA models (i.e. stearic (C18:0), oleic (C18:1), linoleic (C18:2) and palmitic (C16:0) acids). The optimum number of PLS factors was selected by cross-validation using leave-one-out. As spectra pretreatments, several combinations were evaluated, as in the previous section: None, MSC and SNV + DT for scatter correction; first and second derivatives based on Savitzky-Galoy (Savitzky & Golay, 1964)

were also evaluated with a filter with of 5 and a second polynomial order. All data were mean-centered to simplified interpretation.

Evaluation of the models was computed on the validation sets following the procedure described in ISO 12099:2010. The Standard Error of Prediction (SEP) was calculated based on the formula:

$$SEP = \sqrt{\frac{\sum_i^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n}}$$

where y is the reference value and \hat{y} is the predicted value on the i^{th} samples, being n the number of validation samples.

Other statistics used for selecting the best models were: Standard Error of Calibration (SEC), Standard Error of Cross-Validation (SECV) and the Determination Coefficient of Calibration (R^2_c) and Validation (R^2_p).

Furthermore, for comparison purposes, the wavelength range 1600-2208 nm was used for calibration development in all the instruments and analysis modes, since this was the optimized range available in the MEMS-NIRS instrument and in common with the other spectrometers. Moreover, the monochromator wavelengths were interpolated to the same non-constant interval step of the handheld instrument (~ 8 nm) using a piecewise cubic interpolation function which preserve convexity for scattered data (Fernández-Pierna et al., 2010).

Variable Importance in the Projection (VIP) method (Wold et al., 1993) was used to evaluate the relative importance of each wavelength in each of the PLS models. VIP values are computed with the explained sum of squares by the PLS dimension, summed for all dimensions related to the total explained sum of squares by the PLS model and for the total number of wavelengths. Therefore, it is an indicator of the relative importance of the wavelengths in the PLS models. Since the average of squared VIP scores equals 1, influential wavelengths can be considered those with VIP scores greater than 1.

2.3.4. Total error estimations

There are different source of errors which constitute the total error. The method or analytical error and sampling error are the main components.

$$\text{Total error}^2 = \text{method error}^2 + \text{sampling error}^2$$

In this study, in order to estimate the total errors of the different NIRS analysis modes evaluated and compared them with the reference method (GC) total error, five sets of iberian pig samples were used. Each set (i.e. animals which belonged to a livestock farmer and were fed and produced under the same conditions) was composed of 22, 31, 23, 34 and 27 animals, respectively.

The Quality Norm of the iberian pig sector regulated the sampling procedure, according to the number of IP animals of each batch, for their GC analysis (BOE, 2003). For batches with 30 or less animals, it should be analyzed one mean melted fat sample composed of the 100 % of the animals of the batch. From 31 to 150 animals, it should be analyzed one mean sample composed of 30 adipose tissues of the batch randomly selected plus a 20 % of the rest of animals. In case of batches with a size larger than 150 animals, it should be analyzed one sample composed of the 40 % of the animals of the batch randomly selected. This sampling procedure was followed in this study, for the five sets mentioned above, in order to estimate the sampling error.

Each sample was analyzed by GC analysis and the average FA composition of all the animals belonged to a batch was calculated. Sampling error estimation was performed by calculating the standard error between the individual FA composition versus the average composition of the batch for each fatty acid. In batches with more than 31 animals, the selection procedure of the animals comprising the mean sample should be randomly. Since this can have an effect on the error estimation, it was performed 5 random selection procedures for those batches in order to calculate an average estimation. The final sampling error estimation was calculated as the average of the errors obtained for the five sets.

3. Results and discussion

The calculation of the GH values for each sample set, performed individually for analysis mode and device, indicated 10 samples as spectral outliers. Seven outliers were detected on the MEMS-NIRS device, two in the intact adipose tissue FNS analysis and one on the melted fat library. All of them presented a GH larger than 3. Three samples were found with extreme values for some fatty acids in comparison to the average of the sample set and the other seven, most of them collected at the slaughterhouse directly on the carcass with the MEMS-NIRS device, showed slightly spectra changes regarding the average spectra that may be related with the presence in the adipose tissue of some features (blood, not flat surface, etc.) affecting the spectra. Once spectral outliers were detected, they were removed from all the sample sets in order to have the same number of samples (100 samples) in all of them for calibration development, validation and comparison purposes.

Table 1 shows the statistics for the training and validation sets selected following the spectral selection algorithm described in section 2.3.3. Both sets have similar means and standard deviations which indicate an appropriate representation of the variability in both sets, even including samples from the two slaughtering seasons.

Table 1. Descriptive statistics of the iberian sample sets used for training and validation (values expressed as % of total FAs analyzed).

Parameter	Training set (80 samples)				Validation set (20 samples)			
	Min.	Max.	Mean	S.D.	Min.	Max.	Mean	S.D.
Stearic (C18:0)	7.30	14.60	10.49	1.81	7.50	12.90	9.74	1.69
Oleic (C18:1)	45.60	59.10	52.8	3.41	47.70	57.80	53.70	3.02
Linoleic (C18:2)	6.60	12.30	8.50	1.24	7.10	10.90	9.01	1.27
Palmitic (C16:0)	17.30	25.90	21.67	2.15	18.30	25.30	21.07	2.05

Min.: minimum; Max.: maximum; S.D.: standard deviation.

3.1. Calibration performance and comparison of quantitative NIRS analysis of fatty acid profile in iberian pig

The best models developed for each analysis mode and spectrometer are shown in Table 2. The *in-situ* subcutaneous adipose tissue MEMS-NIRS (1600-2208 nm / ~8 nm) analysis performed directly on the carcass at the slaughter process line showed a model's accuracy lower than the other two analysis modes. While the variability explained (R^2_p) in the other applications (melted and intact adipose tissue NIRS analysis) varied from 84 % to 98 %, depending on the fatty acid and sample presentation (melted or intact); in the *in-situ* MEMS-NIRS analysis, the variability explained was 78 % (palmitic acid), 81 % (linoleic acid), 83 % (stearic acid) and 84 % (oleic acid) for each fatty acid. This lower, but high, explained variability occurred together with an increase in the SEP errors in comparison to at-line FNS analysis either intact or melted fat analysis.

As expected, the best results in terms of accuracy (SEP) and explained variability (R^2) were obtained analyzing melted fat samples in transreflectance mode (Table 2). The best models for this analysis mode were obtained with SNV+DT and first derivative spectral pre-processing in the wavelength range 1100-2500 nm with an interval step of 2nm. These statistics are in concordance with other studies developed with IP samples from different feeding regimes. Their SEPs values varied from 0.27 to 0.32 (stearic acid), 0.31 to 0.57 (oleic acid), 0.27 to 0.58 (linoleic acid) and 0.27 to 0.37 (palmitic acid) ([Fernández-Cabanás et al., 2007] and [Pérez-Marín et al., 2007, 2010]). The different set sizes, which may be related with the FA composition variability (range, mean and standard deviation), can influence in the differences observed between studies as the outlier detection procedure.

The best models for intact analysis of transverse subcutaneous adipose tissues in FNS equipped with an interactance fiber optic were obtained in the range 780-2208 nm with a wavelength interval of 2 nm (Table 2). SEPs were larger than those presented for melted fat analysis, especially for oleic acid with a value of 1.25 %. This may be related to tissue structure or sample heterogeneity, apart for the instrument configuration and range used in the calibrations. However, there are several advantages associated to the intact at-

Table 2. Comparative of the FA model statistics depending on the instrument and analysis mode evaluated for different wavelength ranges and intervals.

Parameter	Analysis mode / instrument	Wavelength range and interval (nm)	Data pre-processing*	No. PLS	SEC (%)	SEP (%)	R ² _c	R ² _p	
Stearic (C18:0)	Melted fat / FNS	1100-2500 / 2	1 st der.	7	0.30	0.38	0.97	0.95	
		1600-2208 / 2		5	0.38	0.44	0.95	0.93	
		1600-2208 / ~8		9	0.36	0.40	0.96	0.95	
	Intact adipose tissue / FNS	780-2208 / 2	2 nd der.	4	0.37	0.45	0.96	0.92	
		1600-2208 / 2		5	0.28	0.48	0.97	0.92	
		1600 -2208 / ~8		1 st der.	6	0.45	0.54	0.93	0.89
	Intact carcass / MEMS-NIRS	1600-2208 / ~8	1 st der.	7	0.60	0.68	0.87	0.83	
	Oleic (C18:1)	Melted fat / FNS	1100-2500 / 2	1 st der.	6	0.33	0.35	0.99	0.98
			1600-2208 / 2		9	0.27	0.47	0.99	0.97
1600-2208 / ~8			9		0.42	0.51	0.98	0.97	
Intact adipose tissue / FNS		780-2208 / 2	1 st der.	9	0.49	1.25	0.98	0.84	
		1600-2208 / 2		9	0.42	1.24	0.96	0.84	
		1600 -2208 / ~8		2 nd der.	10	0.57	1.19	0.97	0.87
Intact carcass / MEMS-NIRS		1600-2208 / ~8	1 st der.	7	1.47	1.30	0.81	0.84	

FNS: at-line Foss NIRSystems instrument. MEMS-NIRS: handheld PhazirTM device. der.: derivative.

*All data were pre-processed with SNV and DT followed of the derivate (Savitzky-Golay) indicated in the table and mean centered.

Table 2. Comparative of the FA model statistics depending on the instrument and analysis mode evaluated for different wavelength ranges and intervals.

Parameter	Analysis mode / instrument	Wavelength range and interval (nm)	Data pre-processing*	No. PLS	SEC (%)	SEP (%)	R ² _c	R ² _p	
Linoleic (C18:2)	Melted fat / FNS	1100-2500 / 2	1 st der.	9	0.13	0.19	0.98	0.97	
		1600-2208 / 2		9	0.13	0.28	0.99	0.95	
		1600-2208 / ~8		8	0.23	0.29	0.96	0.95	
	Intact adipose tissue / FNS	780-2208 / 2	1 st der.	11	0.15	0.29	0.98	0.94	
		1600-2208 / 2		9	0.16	0.31	0.98	0.93	
		1600 -2208 / ~8		9	0.24	0.35	0.96	0.92	
	Intact carcass / MEMS-NIRS	1600-2208 / ~8	1 st der.	7	0.52	0.55	0.82	0.81	
	Palmitic (C16:0)	Melted fat / FNS	1100-2500 / 2	1 st der.	7	0.34	0.37	0.97	0.97
			1600-2208 / 2		5	0.42	0.45	0.96	0.95
1600-2208 / ~8			8		0.38	0.41	0.97	0.96	
Intact adipose tissue / FNS		780-2208 / 2	1 st der.	10	0.30	0.79	0.98	0.85	
		1600-2208 / 2		9	0.25	0.85	0.98	0.84	
		1600 -2208 / ~8		9	0.40	0.67	0.96	0.89	
Intact carcass / MEMS-NIRS		1600-2208 / ~8	1 st der.	7	0.84	1.00	0.84	0.78	

FNS: at-line Foss NIRSystems instrument. MEMS-NIRS: handheld PhazirTM device. der.: derivative.

*All data were pre-processed with SNV and DT followed of the derivate (Savitzky-Golay) indicated in the table and mean centered.

line adipose tissue analysis related mainly to simple sample preparation and speed of analysis. Few works have been published regarding the NIRS analysis of intact pork adipose tissues for quantitative FA prediction ([González-Martín et al., 2003], [Pérez-Marín et al., 2009], [Pérez-Juan et al., 2010]). Nevertheless, our SEP errors were in the same range or even lower than those previous results. The influence of the set size and variability of the samples together with the strategies for outlier detection may affect the differences within the errors. Moreover, it should be remarked that the two last approaches ([Pérez-Marín et al., 2009] and [Pérez-Juan et al., 2010]) were based on spectrometers which design provides a reduced sampling area of 20 mm (diameter) (LabSpecPro, ASD) or 5 mm (diameter) (FT-Bruker Matriz-F) compared to the 43 x 43 mm² of the FNS evaluated in this paper.

Figure 2 shows the best oleic acid (healthy mono-unsaturated fatty acid related to the feeding regime of the animals during the last two months prior to slaughter) models for each analysis mode and device. Figure 2a shows a suitable accuracy between measured and predicted values for both training and validation sets using the melted fat model. Figure 2b shows the intact adipose tissue FNS analysis model where two samples had large differences between oleic acid percentage measured and predicted values (this may explain the large increase between SEC and SEP for this analysis mode). Figure 2c shows the oleic acid model for the MEMS-NIRS device, where it can be observed larger differences between measured and predicted values compared to the other analysis modes and instruments for calibration and validation, but, in general, not providing anomalous results. Nevertheless, the *in-situ* analysis with the portable device is a different approach to the other two, since spectra are collected directly on the carcass 2 hours post-slaughter in the process line, what means that environmental conditions are not so controlled as in a laboratory. This aspect, together with the tissue matrix structure and instrumental characteristics (sampling area (Figure 1), wavelength range and/or interval step) make that the increments in SEPs were not so large compared to at-line FNS intact adipose tissue analysis.

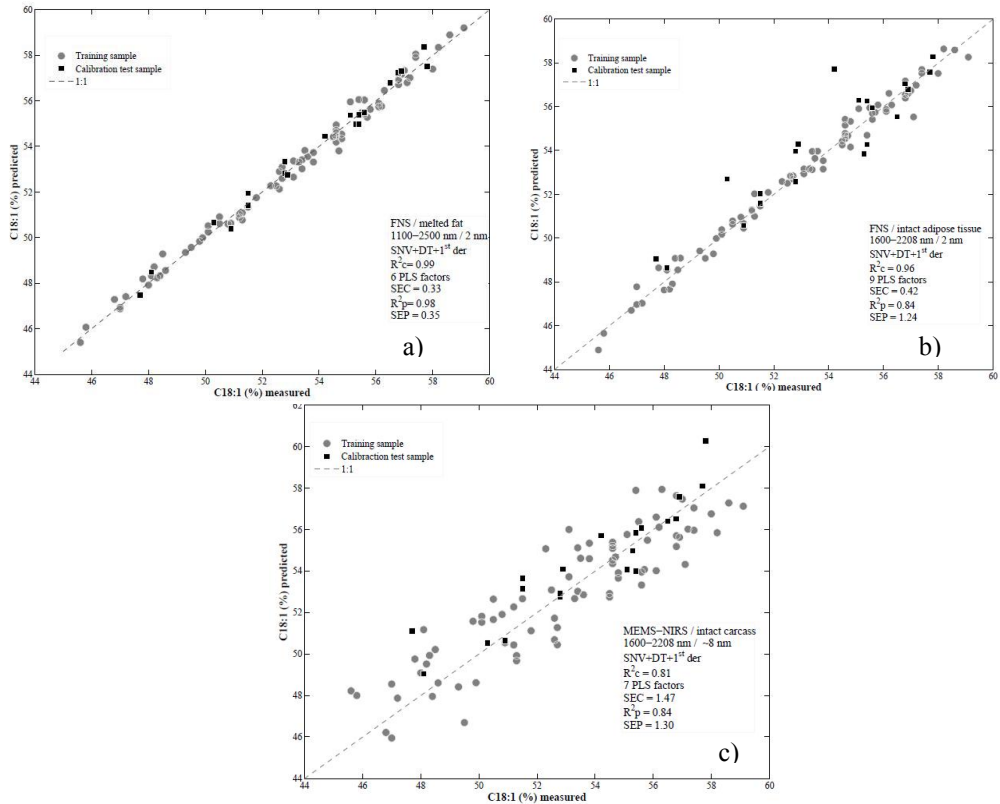


Figure 2. Validation of the calibration NIRS models for different instruments, analysis modes and spectral characteristics: (A) FNS / melted (1100-2500 nm / 2 nm), (B) FNS / intact adipose tissue (780-2208 nm / 2 nm) and (C) MEMS-NIRS / intact carcass (1600-2208 nm / ~8 nm).

In the literature, an on-site approach for the quantitative prediction of the main FAs in IP carcasses was achieved by Pérez-Marín et al. (2009). They performed different NIRS analysis, but the most similar one to our *in-situ* MEMS-NIRS analysis was performed in laboratory conditions with a portable spectrometer (LabSpecPro, ASD), ranging from 450-2300 nm with an interval step of 1 nm, on transverse cut of backfat samples (similar sample presentation than in our case since they collected spectra from the two subcutaneous adipose tissue layers). Their models explained a variability of 64 % (linoleic acid), 84 % (stearic acid), 90 % (oleic acid) and 93 % (palmitic acid) with SECV values of 0.35 %, 0.54 %, 1.05 % and 0.65 %, respectively. These are lower errors than those SEP presented here for the MEMS-NIRS device (Table 2). However, it should be remarked that their models, evaluated by cross-validation, were developed in at-line conditions using a larger spectra range and shorter wavelength interval step of 1 nm with a reduced sample set composed only of 52 IP samples. This differs from the spectral characteristics of the *in-situ* MEMS-NIRS analysis (1600-2400 nm, with a non-constant

interval step of around 8 nm). Moreover, the device evaluated by Pérez-Marín et al. (2009) has a sampling area of 20 mm (diameter), while the spot area of the MEMS-NIRS instrument is of 8 x 10 mm² (equal to diagonal of 12.8 mm). Nevertheless, the portable post-dispersive spectroradiometer has a weight of around 7 kg versus the 1.8 kg of the MEMS-NIRS device which enable simpler and faster ready-available results on the display.

As it might be expected, the results obtained in the laboratory with table-size high performance spectrometers were better than *in-situ* NIRS analysis with a portable device in the carcass process line. Moreover, in the laboratory, melted fat analysis showed a better predictive ability than intact adipose tissue analysis. However, although a loss of performance was observed for the *in-situ* application, the results obtained from carcass analysis could be acceptable depending on the application based on the practical advantages of this kind of fast, simple, cost-efficient, non-destructive and individual analysis. In order to get clearer conclusions about the loss in performance of the *in-situ* analysis and to know the possible influence on the results of the instrument design's characteristics (optic design, spectral range and/or wavelength interval step), a comparison based on the common wavelength range (1600-2208 nm) for all the instruments and interval step (~8 nm) was performed (Table 2). This can help to compare the results between the handheld MEMS-NIRS instrument and the high-resolution monochromators (FNS) considering the inter-instrument variations.

Table 2 shows the best models for each instrument and analysis mode developed with the common wavelength range for all of them (1600-2208 nm), obtained with the original interval step for each instrument (2 nm for FNS and a non-constant step of around 8 nm for the MEMS-NIRS device). The comparison indicates that for melted fat models, when the wavelength range was reduced from 450-2500 nm to 1600-2208 nm with the same initial resolution of the instrument (2 nm), the SEP values incremented for stearic acid a 13.63 %, 25.53 % for oleic acid, 32.14 % for linoleic acid and 17.77 % for palmitic acid. Moreover, the number of PLS factors used also went up, indicating a more complexity of the models, except for linoleic acid. In the case of intact adipose tissue analysis with the fiber optic in FNS, the results showed that the SEP values were not so different between using the range 780-2208 nm with a wavelength interval step of 2 nm and the range 1600–2208 nm with the same interval step. The models differences in terms of SEPs were of 6.25 % (stearic), -0.8 % (oleic), 6.45 % (linoleic) and 7.05 % (palmitic). These results indicate that the wavelength range reduction had not a very severe effect on the models. In fact, Sato et al. (1991) indicated that the wavelength 1600-2200 nm were the most suitable range for quantitative FA profile NIRS analysis in vegetable oils.

If the comparison is performed taking into account not only the reduction in wavelength range, but also the wavelength interval step effect from 2 nm to a

non-constant step of around 8 nm, as in the MEMS-NIRS spectrometer, the results indicated that, in general, the SEP values for melted fat and intact adipose tissue models developed in FNS went up, while the variability explained (R^2) was reduced compared to the initial models developed with the full optimized wavelength range and resolution and also compared to the models developed with the reduced wavelength range but preserving the interval step of 2 nm (Table 2). Nevertheless, it was observed that the effect depends on the fatty acid of interest. The oleic acid parameter was one of the most affected by the reduction in the wavelength interval step, after linoleic acid, specially for FNS melted fat analysis which statistics varied from 0.35 % (SEP) and 0.98 (R^2_p) to 0.51 % (SEP) and 0.97 (R^2_p).

The handheld device presented a SEP increment of 20.58 % (stearic acid), 8.46 % (oleic acid), 36.36 % (linoleic acid) and 33 % (palmitic acid), while the R^2_p values were reduced in 7.22 %, 3.57 %, 13.58 % and 14.10 % for each FA, respectively, when these models were compared with the intact adipose tissue NIRS analysis under the same spectral conditions as in the MEMS-NIRS spectrometer (1600-2208 nm / \sim 8 nm). This may mean that, although both instruments were working in the same wavelength range and interval step, certain differences in instrument design and analysis conditions favor a quantitative approach developed in the monochromator.

Generally speaking, the combined effect of the wavelength range and interval step reduction as the MEMS-NIRS device was more severe on the models to predict FA profile, either in melted fat or intact adipose tissue at-line analysis, than only the reduction in the wavelength range. Moreover, it could be that other factors such as environment (slaughterhouse vs. laboratory), fat presentation mode (carcass vs. piece of fat / fresh vs. thawed), measurement time (3 s vs. 60 s), time between standard reference analysis (every 15 min \approx 90 samples vs. each sample) and/or sampling area (8 x 10 mm² vs. 43 x 43 mm²) can influence in the models accuracy obtained with the MEMS-NIRS spectrometer versus the high-performance monochromators. The effect of the sampling area can be related with the issue that the adipose subcutaneous tissue is composed of two sub-layers, which changes a little bit in composition (Daza et al., 2007), and although 4 scans were obtained per sample (2 scans per sub-layer), bigger sampling area can be better in order to obtain a more representative spectra of the all sample, as it is analyzed on FNS (Figure 1). The instrumental noise seemed not to be involved since the RMS values of 10 scans of the instrument's standard reference were 253 $\mu\log(1/R)$ for at-line FNS provided with the fiber optic and 239.1 $\mu\log(1/R)$ for the handheld device.

The step from melted fat to intact adipose tissue NIRS analysis at the laboratory with table-size high-performance monochromators has showed a loss of performance which increase when the models are developed for *in-situ* NIRS analysis at the carcass process line. Nevertheless, these errors, together

with practical and technical advantages afforded by the handheld MEMS-NIRS device (simple, *in-situ* and cost-efficient analysis with readily-available results in 3 seconds that can be incorporated in cloud support decision systems), can be suitable to consider this approach as screening technique/tool for FA quantitative control of individual pig carcasses at the slaughterhouse.

One important issue can support this last statement and can provide a more real interpretation and estimation of the total errors obtained by the different analysis modes and, even, by the reference analysis. As it is known, GC analysis is a cost and laborious analytical technique. As it was exposed on section 2.3.4, only one sample is analyzed by batch of animals with this technique, according to the Spanish legislation. The average sample is analyzed and, then, the composition obtained is assigned to all the animals. Averaging a set of individual measurements can reduce the stochastic error but can introduce a sampling error, particularly important for irregularly IP batches influenced by the individual metabolism of the animals or the natural resources available in the field during the fattening. Therefore, an estimation of the total error as a combination of the measurement error and the sampling error can provide a more reliable interpretation of the models prediction ability.

The sampling errors, calculated as the standard error between the individual FA composition and the average composition of the batch based on GC analysis, was calculated with five IP sets. The average sampling errors were 0.84 % (palmitic acid), 0.75 % (stearic acid), 0.98 % (oleic acid) and 0.53 % (linoleic acid). This highlights the relevance of the sampling when an average analysis is used instead of individual measurements. GC and NIRS analysis of melted fat, due to its laborious sample preparation procedure, may be based on sampling strategies, but for at-line intact NIRS analysis, it can be supposed that it is possible to do an individual analysis of all the carcasses. There is no doubt in this aspect for the *in-situ* and non-destructive analysis in the carcass process line with handheld instruments, where the 100 % of all the carcasses can be controlled under real industrial conditions. In Table 3 is presented the total error estimation for the reference method and for the difference NIRS analysis modes based on the formula described on section 2.3.4. The estimations obtained indicate quite similar global errors for all the methods when the sampling contribution is considered. This underscores that the *in-situ* NIRS application evaluated in this study which enables individual carcass analysis, for estimating the main fatty acids present in iberian pig adipose tissue, provides a similar accuracy as the analysis of the average sample of a batch by GC. Nevertheless, further work is in progress to enlarge the data sets and to evaluate and minimize the effect caused but factors such as sampling area.

Table 3. Estimation of the total errors (%) of the main fatty acids in pig adipose tissue analyzed by gas chromatography and different NIRS analysis modes.

Analytical technique / analysis mode	Stearic acid (C18:0)	Oleic acid (C18:1)	Linoleic acid (C18:2)	Palmitic acid (C16:0)
GC*	0.78	1.01	0.55	0.88
NIRS: at-line melted fat (FNS) *	0.84	1.04	0.56	0.92
NIRS: at-line intact fat (FNS) ^	0.45	1.25	0.29	0.79
NIRS: <i>in-situ</i> carcass (MEMS-NIRS) ^	0.68	1.30	0.55	1.00

*GC and at-line NIRS melted fat total errors include method and sampling errors

^At-line NIRS intact fat and *in-situ* carcass total errors only include method errors.

3.2. Understanding fatty acid absorptions in iberian pig NIR spectra

Since one of the factors highlighted in this study has been the effect of the wavelength range and interval step in the model performance, a deeper study of this issue was attempted using Variable Importance in the Projection (VIP) values, which shows the major wavelength contributions for each calibration model. Figure 3 shows the VIP scores for each parameter and analysis mode.

In general, it was observed for the common wavelength range between instruments, independently of the analysis mode or instrument, that the main regions with VIP values larger than 1 for all the FAs (although some differences for each FA) were in the 1650-1830, 1860-1940 and 2090-2200 nm regions. Nevertheless, the VIP scores for melted fat in FNS, which showed clearer absorption bands than the other analysis modes, indicated other important regions for the calibration models such as 2250-2360 and 2440-2480 nm or in the case of intact adipose tissue in FNS were in 1140-1230 and 1380-1430 nm. The wavelengths around 1200, 1400 and 1900 nm are well-known water related bands which showed high VIP scores in the case of intact tissue either using the FNS or the MEMS-NIRS instrument, probably coming from the tissue structure. This may indicate that the VIP differences in the FNS between melted and intact fat models may come from the different physical state (liquid-solid) of the samples.

Figure 3a shows the VIP values of the stearic models for all the analysis modes, Figure 3b in the case of oleic acid, Figure 3c for linoleic acid and Figure 3d for palmitic acid. Due to the different wavelength interval step of the MEMS-NIRS instrument, it was observed, independently of the FA, a shift in

the wavelengths showing high VIP values in comparison to FNS with a 2 nm interval step.

Trying to observe specific wavelengths for any FA, the VIP values obtained for the melted fat models were used since they were quite well-defined absorption bands in the raw spectra. All the FAs showed high VIP values at the same wavelengths with slightly differences, since they derived from C-H stretching combinations with other vibrational modes (Westad et al., 2008). Linoleic acid showed larger VIP values at 1696 and 1720 nm, shifted to shorter wavelengths compared to the rest of FAs. This observance is in agreement with other authors that studied the NIRS spectral patterns concerning fatty acid composition. Sato (2011) observed for soybean powder that the band at 1720 nm appearance when un-saturation (C18:2) in the FAs increased in the samples and it was shifted to longer wavelength when the carbon chain length of the FAs increased.

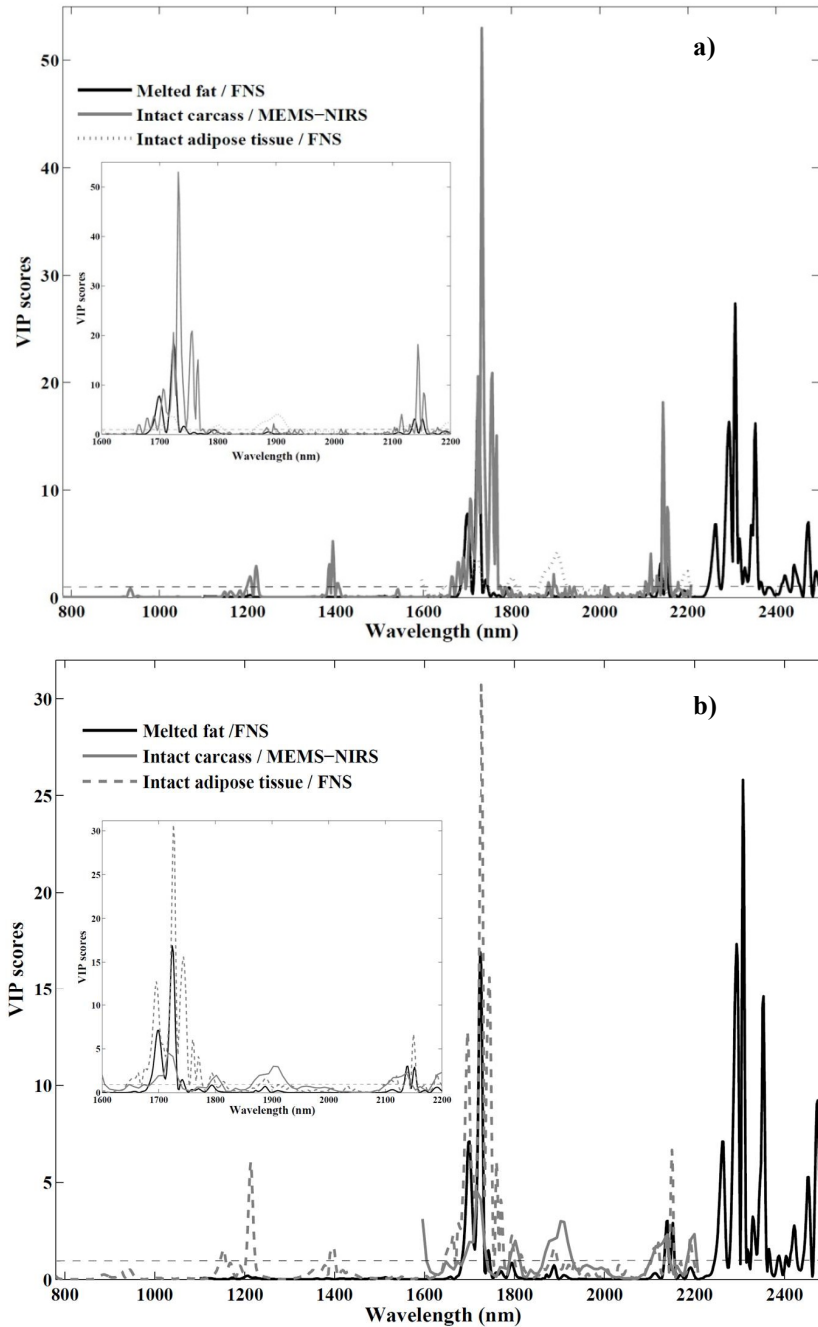


Figure 3. Variable Importance in the Projection (VIP) values for the wavelengths involved on the calibration NIRS models for different instruments and analysis modes: (A) Stearic acid and (B) Oleic acid.

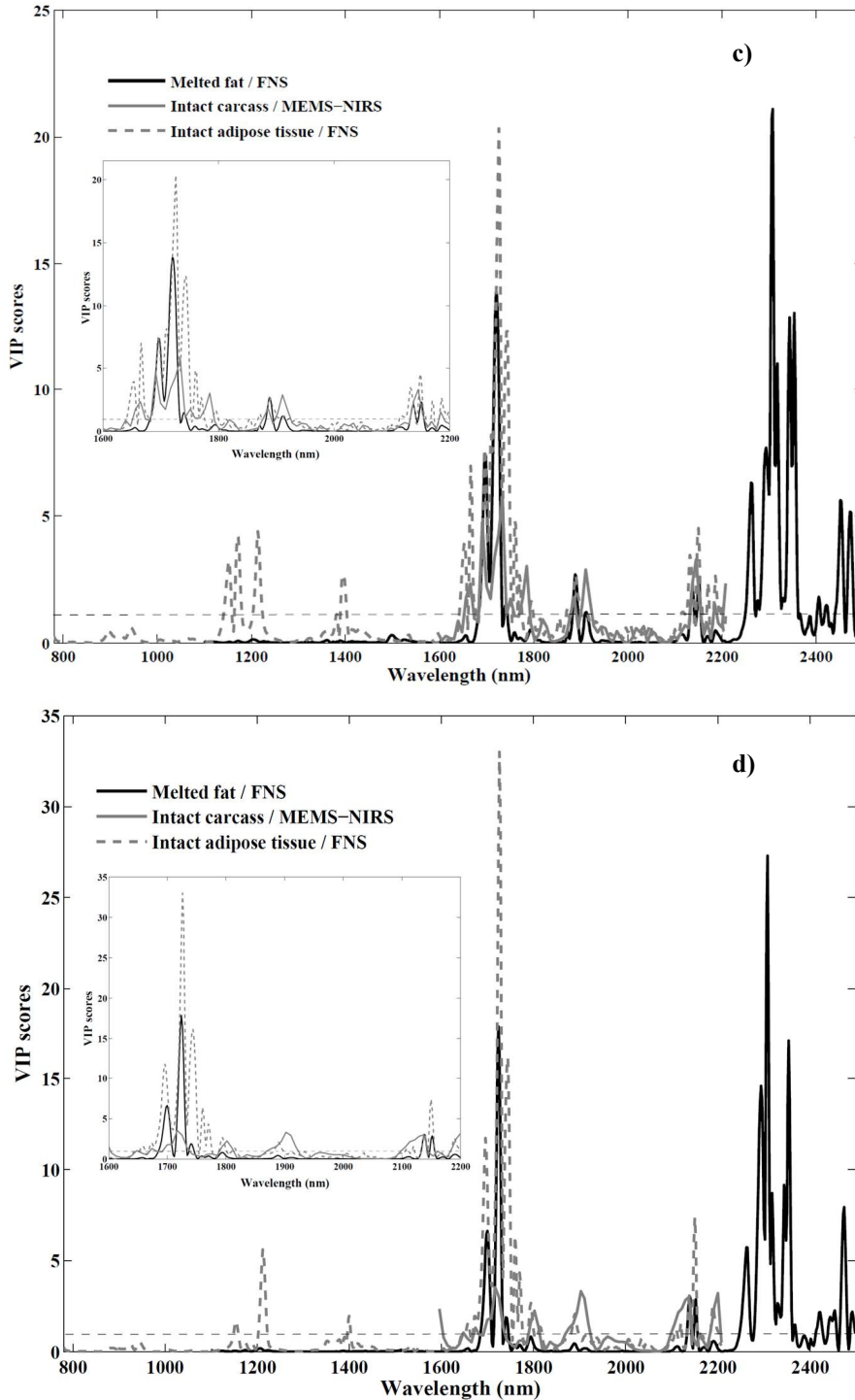


Figure 3. Variable Importance in the Projection (VIP) values for the wavelengths involved on the calibration NIRS models for different instruments and analysis modes: (C) Linoleic acid and (D) Palmitic acid.

These results highlight that important wavelength ranges for the development of FA quantitative NIR models are presented in ranges not covered by the actual MEMS-NIRS device evaluated in this paper, which could be interesting to include in future instrumental designs for this kind of applications. Moreover, it was observed that wavelengths between 2240-2480 nm also include spectral information related to FAs that can help to improve the model performance of intact adipose tissue models if the NIRS instruments used enable its measurement with a suitable signal to noise ratio.

4. Conclusions

The research conducted shows that the handheld MEMS-NIRS spectrometer evaluated can meet the needs of the iberian pig industry for an *in-situ*, fast, simple, individual and cost-efficient screening analysis for quantitative fatty acid profile of iberian pig carcasses directly on the process line. Certain advantages over at-line high-resolution monochromators have been highlighted regarding analysis cost, speed or sample presentation and analysis what can enable an increment in the sampling and control of the process. The total errors estimated, as a combination of the measurement error and the sampling error, indicated the similarity in the accuracy of the *in-situ* analysis in comparison to other NIRS analysis approach and even with the reference method. Nevertheless, some instrumental design characteristics on MEMS-NIRS instruments such as wavelength range, spectral resolution or sampling area size have been analyzed in order to optimize and adapt this instrumentation for this kind of application. Wavelength bands related to fatty acids in pork NIR spectra have been highlighted in this paper what can help in the development of quantitative models as in the adaptation of current instrumentation.

Acknowledgment

This work was financed by the Research Project INIA “RTA 2008-00026-C07” and Research Excellence Program of the Andalusian Regional Government (Project nº P09-AGR-5129). The authors are grateful to the Protected Designation of Origin Los Pedroches and to the iberian pork industries COVAP S.C.A., Embutidos Camilo Ríos S.L. and Sierra de Sevilla for providing experimental materials. Thanks are also given to Antonio López-López, Manuel Sánchez-Calderón and María del Carmen Fernández-Fernández for their technical assistance. Part of these analysis were performed in the facilities of the “Unidad de Espectroscopía NIR/MIR” of the SCAI at the University of Córdoba. EZR acknowledges the financial support of the Spanish Ministry of Education as a fellow of the Program “Training of University Teachers” (Formación del Profesorado Universitario, FPU. AP2008-00838).

References

Barnes, R.J., Dhanoa, M.S., & Lister, S.J. (1989). Standard normal variate transformation and de-trending of near infrared diffuse reflectance spectra. *Applied Spectroscopy*, 43 (5), 772-777.

BOE. (2003). ORDEN APA/213/2003, de 10 de febrero, por la que se establecen normas de desarrollo del Real Decreto 1083/2001, de 5 de octubre, por el que se aprueba la Norma de calidad para el jamón ibérico, paleta ibérica y caña de lomo ibérico elaborados en España. BOE nº 36.

BOE. (2004). Orden PRE/3844/2004. Orden, de 18 de noviembre, por la que se establecen los métodos oficiales de toma de muestras en canales de cerdos ibéricos y el método de análisis para la determinación de la composición de ácidos grasos de los lípidos totales del tejido adiposo subcutáneo de cerdos ibéricos. BOE nº 283.

BOE. (2007). Real Decreto 1469/2007, de 2 de noviembre, por el que se aprueba la norma de calidad para la carne, el jamón, la paleta y la caña de lomo Ibéricos. BOE nº 264.

De Pedro, E., Casillas, M., & Miranda, M. (1997). Microwave oven application in the extraction of fat from the subcutaneous tissue of Iberian pig ham. *Meat Science*, 45 (1), 45–51.

De Pedro, E., Garrido, A., Bares, I., Casillas, M., & Murray, I. (1992). Application of near infrared spectroscopy for quality control of Iberian pork industry. In K.I. Hildrum, R. Isaksson, T. Naes, & A. Tandberg (Eds.), *Near infrared spectroscopy bridging the gap between data analysis and NIR applications*, (pp. 345-348), Ellis Horwood, U.K.

De Pedro, E., Núñez, N., García, J., Aparicio, D., Campos, M.I., & Pérez, M. (2007). Implementing near infrared spectroscopy in the Iberian pig industry. *Options Méditerranéennes Série A*, 76, 225-228.

EU. (2011). Position (EU) No 7/2011 of the Council at first reading with a view to the adoption of a Regulation of the European Parliament and of the Council on the provision of food information to consumers, amending Regulations (EC) No 1924/2006 and (EC) No 1925/2006 and repealing Directives 87/250/EEC, 90/496/EEC, 1999/10/EC, 2000/13/EC, 2002/67/EC, 2008/5/EC and Regulation (EC) No 608/2004. *Official Journal of the European Union*, 54, 1-59.

Fernández, A., De Pedro, E., Núñez, N., Silió, L., García-Casco, J., & Rodríguez C. (2003). Genetic parameters for meat and fat quality and carcass composition traits in Iberian pigs. *Meat Science*, 64, 405-410.

Fernández-Cabanás, V.M., Garrido-Varo, A., García-Olmo, J., De Pedro-Sanz, E., & Dardenne, P. (2007). Optimisation of the spectral pre-treatments

used for Iberian pig fat NIR calibrations. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 87, 104-112.

Fernández-Cabanás, V.M., Polvillo, O., Rodríguez-Acuña, R., Botella, B., & Horcada, A. (2011). Rapid determination of the fatty acid profile in pork dry-cured sausages by NIR spectroscopy. *Food Chemistry*, 124 (1), 373-378.

Fernández-Pierna, J.A., Vermeulen, P., Lecler, B., Baeten, V., & Dardenne, P. (2010). Calibration transfer from dispersive instruments to handheld spectrometers. *Applied Spectroscopy*, 64, 644-648.

García-Olmo, J. (2002). Clasificación y autenticación de canales de cerdo Ibérico mediante espectroscopía en el infrarrojo cercano (NIRS). PhD Thesis. University of Córdoba.

García-Olmo, J., Garrido-Varo, A., & De Pedro, E. (2001). The transfer of fatty acid calibration equations using one set of unsealed liquid standardisation samples. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 9, 49-62.

Garrido-Varo, A., & De Pedro, E. (2007). The role of near-infrared spectroscopy in verifying label information in agro-forestry products. In D.A. Burns and E.W. Ciurczak (Eds.) *Handbook of Near-Infrared Analysis* (3rd Edition) (pp. 387-397). CRC Press, Boca Raton, FL, USA.

Garrido-Varo, A., García-Olmo, J., & Pérez-Marín, D. (2004). Analysis of fats and oils. In C. Roberts, J. Workman and J. Reeves (Eds.) *Near-infrared spectroscopy in agriculture*. (pp. 487-558). Agronomy, Crop science and soil science societies of America. Madison, WI, USA.

Geladi, P., MacDougall, D., & Martens, H. (1989). Linearization and scatter-correction for near-infrared reflectance spectra of meat. *Applied Spectroscopy*, 39, 1193-1202.

González-Martín, I., González-Pérez, C., Hernández-Méndez, J., Álvarez-García, N., & Lázaro, S.M. (2002). Determination of fatty acids in subcutaneous fat of Iberian breed swine by near infrared spectroscopy. A comparative study of the methods for obtaining total lipids: solvents and melting with microwaves, *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 10, 257-268.

González-Martín, I., González-Pérez, C., Álvarez-García, N., & González-Cabrera, J.M. (2005). On-line determination of fatty acid composition in intramuscular fat of Iberian pork loin by NIRS with a remote reflectance fibre optic probe. *Meat Science*, 69, 243-248.

González-Martín, I., González-Pérez, C., Hernández-Méndez, J., & Álvarez-García, N. (2003). Determination of fatty acids in the subcutaneous fat of Iberian breed swine by near infrared spectroscopy (NIRS) with a fibre-optic probe. *Meat Science*, 65, 713-719.

Howard, M., & Workman, Y. (1991). *Statistics in Spectroscopy*. Inc. NY: Academic Press.

ISO 12099:2010. (2010). *Animal feeding stuffs, cereals and milled cereal products Guidelines for the application of near infrared spectrometry*. <http://www.iso.org>

Martens, H., & Næs, T. (1985). Multivariate calibration by data compression. En H.A. Martens (Ed.), *Multivariate Calibration. Quantitative Interpretation of Non-selective Chemical Data*, (pp. 167-286). PhD thesis, Technical University of Norway, Trondheim.

Pérez-Juan, M., Afseth, N.K., González, J., Díaz, I., Gispert, M., Furnols, M.F.I., Oliver, M.A., & Realini, C.E. Prediction of fatty acid composition using a NIRS fibre optics probe at two different locations of ham subcutaneous fat. *Food Research International*, 43 (5), 1416-1422

Pérez-Marín, D., De Pedro, E., Guerrero-Ginel, J.E., & Garrido-Varo, A. (2009). A feasibility study on the use of near-infrared spectroscopy for prediction of the fatty acid profile in live Iberian pigs and carcasses. *Meat Science*, 83, 627-633.

Pérez-Marín, D., Fearn, T., Guerrero, J.E., & Garrido-Varo A. (2010). Robustness in pig fat NIRS calibrations by orthogonal projection. *Chemometrics and Intelligent Laboratory System*, 100, 36-40.

Pérez-Marín, D., Garrido-Varo, A., De Pedro, E., & Guerrero-Ginel, J.E. (2007). Chemometric utilities to achieve robustness in liquid NIRS calibrations: application to pig fat analysis. *Chemometrics and Intelligent laboratory Systems*, 87, 241-246.

Ripoche, A. & Guillard, A.S. (2001). Determination of fatty acid composition of pork fat by Fourier Transform infrared spectroscopy. *Meat Science*, 58, 299-304.

Sato, T. (2011). Estimation of fatty acid composition in soybean powder by examining near infrared spectroscopic patterns. *Biochemistry, Chemistry and Physiology*, 28, 507-520.

Sato, T., Kawano, S., & Iwamoto, M. (1991). Near infrared spectral patterns of fatty acids analysis from fats and oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 68, 827-833.

Savitzky, A., & Golay, M.J.E. (1964). Smoothing and differentiation of data by simplified least squares procedures. *Analytical Chemistry*, 36 (8), 1627-1639.

Shenk, J.S., & Westerhaus, M.O. (1991). Population structuring of near infrared spectra and modified partial least squares regression. *Crop Science*, 31, 1548-1555.

Shenk, J.S., & Westerhaus, M.O. (1995). Analysis of agriculture and food products by near infrared reflectance spectroscopy. Monograph NIRSystems.

Shenk, J.S., & Westerhaus, M.O. (1996). Calibration the ISI way. In A.M.C. Davies & P.C. Williams (Eds.), *Near infrared spectroscopy: The future waves* (pp. 198–202). Chichester, UK: NIR Publications.

Tejerina, D., García-Torres, S., de Vaca, M.C., Vázquez, F.M., & Cava, R. (2012). Study of variability in antioxidant composition and fatty acids profile of longissimus dorsi and serratus ventralis muscles from Iberian pigs reared in two different montanera seasons. *Meat Science*, *90* (2), 414-419.

Westad, T., Schmidt, A., & Kermist, M. (2008). Incorporating chemical band assignment in near infrared spectroscopy regression models. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, *16*, 265-273.

Williams, P.C., & Sobering, D. (1996). How do we do it: A brief summary of the methods we use in developing near infrared calibrations. In A.M.C. Davies, P.C. Williams (Eds.), *Near Infrared Spectroscopy: The Future Waves*, (pp. 185-188), NIR Publications, Chichester, UK.

Wold, S., Johansson, E., & Cocchi, M. (1993). PLS—Partial least squares projections to latent structures. In H. Kubinyi (Ed.), *3D QSAR in drug design: theory, methods, and applications* (pp. 523–550). Leiden: ESCOM.

Wold, S., Sjöström, M., & Erikson, L. (2001). PLS-regression: a basic tool of chemometrics. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, *58*, 109-130.

Zamora-Rojas, E., Pérez-Marín, D., De Pedro-Sanz, E., Guerrero-Ginel, J.E., & Garrido-Varo, A. (2012). *In-situ* Iberian pig carcass classification using a micro-electro-mechanical systems (MEMS)-based near infrared spectroscopy. *Meat Science*, *90*, 636-642.

5.4. Transferencia de modelos de calibración NIRS desarrollados en laboratorio a instrumentos portátiles MEMS-NIRS

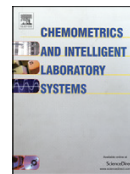
Uno de los objetivos más importantes de cara al convencimiento del sector industrial para la implantación de métodos *in situ* y *on-line* es el poder aprovechar bases de datos espectrales obtenidas durante años para ser utilizadas en nuevos instrumentos que aparecen en el mercado. Un ejemplo lo constituye la posibilidad de poder transferir bases de datos y calibraciones desarrolladas en instrumentos de altas prestaciones científico-técnicas como monocromadores a equipos MEMS-NIRS. Para ello, como se ha mencionado en la revisión bibliográfica (sección 3.3.3), es necesaria la transferencia de modelos de calibración y bases de datos entre ambos equipos NIRS o, lo que es lo mismo, la estandarización de ambos instrumentos (ya tengan las mismas características de diseño e incluso procedan del mismo fabricante o difieran en ellas) para que los espectros tomados en ellos sean similares. De este modo, se ponen en valor todo el trabajo realizado previamente en un determinado equipo sin la necesidad de empezar desde cero cada vez que se quiera implementar un nuevo avance en cuanto a instrumentación.

En este apartado se presenta una publicación que evalúa distintas metodologías y algoritmos para la transferencia de bases de datos y modelos de carne picada de cerdo ibérico entre equipos NIRS de altas prestaciones científico-técnicas y equipos portátiles MEMS-NIRS.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chemolab

Handheld NIRS analysis for routine meat quality control: Database transfer from at-line instruments

E. Zamora-Rojas*, D. Pérez-Marín, E. De Pedro-Sanz, J.E. Guerrero-Ginel, A. Garrido-Varo

Department of Animal Production, Non-Destructive Spectral Sensor Unit, Faculty of Agricultural and Forestry Engineering, University of Córdoba, Agrifood Campus of International Excellence (ceiA3), Campus Rabanales, N-IV, km 396, Córdoba 14014, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 December 2011

Received in revised form 26 January 2012

Accepted 5 February 2012

Available online 10 February 2012

Keywords:

NIRS

MEMS instrument

Database transfer

Quantitative analysis

Meat quality

Iberian pig

ABSTRACT

Innovative advances in Near Infrared Spectroscopy (NIRS) instrumentation have enabled the development of new miniaturized spectrometers that combine NIRS technology with micro-electro-mechanical platforms, thus opening up new horizons for industrial NIRS applications. Many agro-food industries, laboratories and research centres already have large databases/libraries, built up over many years using NIR spectrometers; it is clearly important to preserve these data sets in order to avoid having to research and develop NIRS applications from scratch every time a new instrument appears on the market. Three standardization algorithms—Direct Standardization (DS), Piecewise Direct Standardization (PDS) and Spectral Difference by Wavelengths (SDW)—and varying numbers of standardization samples were evaluated for transferring meat quality databases from a high-performance at-line NIRS monochromator to a handheld based on micro-electro-mechanical systems (MEMS) NIRS spectrometer. The SDW algorithm and the use of 8 standardization samples yielded the best Standard Error of Prediction (SEP) values for the three chemical parameters transferred (0.72% for fat, 0.73% for moisture and 0.66% for protein). The successful transfer of the database to the MEMS-NIRS device enables a new approach for fast, low-cost, on-line/in-situ analysis of meat products.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Near Infrared Spectroscopy (NIRS) has been widely tested for the quantitative prediction of chemical composition in meat products. High-performance spectrometers working in controlled laboratory environments—i.e. at-line—have demonstrated potential for this purpose, though sample preparation remains laborious; several on-line approaches have been also tested [1–4]. However, for industrial purposes there is clearly a need for cost-effective, non-destructive, quality control systems that enable measurements to be made quickly, accurately and easily. Traditional NIR spectroscopy sensor designs are not suited to these challenges, and recent years have seen the development and marketing of new handheld devices offering a whole range of advantages: small size, robustness, low cost, ergonomic design, ease of analysis, simple user interface and portability. These new devices enable new applications to be implemented directly in an industrial setting [5].

The many databases constructed to date for at-line analysis using non-portable instruments have required considerable investments in terms of time (years), resources, labour and analytical costs. Moreover, they may contain specific samples which are critical for the

construction of robust models, since they represent the variability encountered over a long period. It is clearly crucial to preserve these data sets in order to avoid having to research and develop NIRS applications from scratch every time a new instrument appears on the market. However, calibration models obtained using one instrument cannot yet be readily used on a different instrument, even when the optical and electronic design is the same since they do not produce exactly the same spectrum for the same sample analyzed [6], due to a number of constraints such as wavelength accuracy, dynamic range, distance of sample to optics, detector photometric response or functionality changes with temperature [7]. Fearn [8] and Feudale et al. [9] have reviewed various mathematical algorithms and methodologies, known as calibration transfer or standardization strategies, to transform models or data measured on a given device so that they can be used by a different device.

Miniature handheld near-infrared (NIR) spectrometers are powerful instruments that can be based on a combination of micro-electro-mechanical system (MEMS) technology and digital transform spectroscopy (DTS), although there are other technologies to design this kind of devices. They have several advantages over traditional instrumental designs, especially for non-destructive on-line or in-situ analysis. The MEMS silicon chip is a fixed, rapidly-tunable, high-contrast pixelate optical filter or diffraction grating for wavelength selection. Used in conjunction with DTS and a single detector, it enables equipment costs to be lowered, while ensuring the elimination

* Corresponding author at: Campus Rabanales, N-IV, km 396, Córdoba 14014, Spain. Tel./fax: +34 957 21 85 55.

E-mail address: ezamora@uco.es (E. Zamora-Rojas).

of detector noise and providing a robust design with non-moving parts [10]. A number of recent papers have evaluated this technology in the agro-food area [11–15].

A large feed dataset has been successfully transferred from a NIRS scanning monochromator instrument to a MEMS-NIRS spectrometer using a simple correction based on the Spectral Differences at each Wavelength between the two instruments (SDW algorithm) [12]. However, no published studies have yet focused on transferring calibration models for predicting quantitative chemical composition in highly moisture-sensitive meat products. There are two critical factors in the database transfer process: the mathematical algorithm applied for standardization and the use of an optimal number of standardization samples [8,9,16].

The purpose of this study is to transfer calibration models for predicting meat chemical composition (fat, moisture and protein) to a handheld MEMS-NIRS instrument, with no significant loss of performance, from a NIRS monochromator using a large database built up over a number of years using the latter high-performance at-line spectrometer. So, the present study sought to evaluate the performance of three standardization algorithms: Direct Standardization (DS) and Piecewise Direct Standardization (PDS) are fast, easy-to-use algorithms which have provided good results in similar studies; and the Spectral Differences at each Wavelength (SDW) algorithm has also performed well with the MEMS-NIRS instrument tested here. At the same time, the study aimed to optimize the number of standardization samples required when transferring databases and calibrations from a NIRS scanning monochromator (slave) to a MEMS-NIRS handheld instrument (master).

2. Materials and methods

2.1. Sample sets

A dataset of 342 Iberian pork-muscle samples (set *O*) captured using a high-performance NIRS monochromator was transferred to a handheld MEMS-NIRS spectrometer. The dataset comprised spectra for several ground Iberian pork muscles (*gluteus medius*, *masseter* and *longissimus dorsi*) collected in various years (1999, 2000, 2001, 2003, 2004 and 2009). The salient features of this database—sample characteristics, population structures, NIRS measurements, spectral repeatability, reference analysis and calibration development—have been described in detail by Zamora-Rojas et al. [17].

A separate set of 235 samples of ground Iberian pork muscle (*longissimus dorsi*) collected in 2010 was used for standardization and evaluation. When investigating highly moisture-sensitive products such as meat, most authors recommend the use of real samples rather than generic standards to perform the standardization, since the latter cannot represent the entire experimental domain or the range of spectrum patterns encountered for these products [8]. The SELECT algorithm developed by Shenk and Westerhaus [18]—a function available in the WinISI software package for choosing the most representative samples based on a Mahalanobis distance analysis—was used to split the dataset into a standardization set (30 samples, set *S*) and a validation-test set (205 samples, set V_{spec}) in order to enable spectral evaluation of the database transfer. In order to determine the optimal number of standardization samples required by each algorithm, the standardization set (set *S*) was subdivided into 12 sub-groups comprising 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20 and 30 samples, respectively. In each case, the samples contained in the sub-group were identified by the SELECT algorithm as the most representative of the 30-sample standardization set. Sixty samples from the 205-sample validation set (set V_{spec}), also selected as the most representative using the SELECT procedure, were analyzed by wet chemistry for protein (ISO-R-1443), fat (ISO-R-937) and moisture (ISO-R-1442). These 60 samples, henceforth referred to as set V_{pre} , were used for validation of the calibration models transferred. These selections

were based on MEMS-NIRS spectra since this instrument is the master.

2.2. Near Infrared Spectroscopy analysis

Two instruments were used for measuring the sample sets described above (sets *S* and V_{spec}); set *O* was measured only on the monochromator instrument:

1. A high-performance at-line NIRS monochromator (FNS) (Foss NIR-Systems 6500 spectrometer, Foss-NIRSystems Inc., Sylver Spring, MD, USA), equipped with a spinning module. The instrument operates in the 400–2500 nm spectral range with a spectral wavelength interval of 2 nm. Ground and homogenized samples were analyzed in standard circular cups (diameter 3.75 cm). Two sub-samples were analyzed for each sample and each spectrum was the average of 32 scans collected in reflectance mode.
2. A handheld MEMS (micro-electro-mechanical system)-based NIRS digital transform spectrometer (MEMS-NIRS) (Phazir1624, Polychromix Inc., Wilmington, MA, USA), working in reflectance mode in the spectral range 1600–2400 nm with a non-constant interval of around 8 nm (pixel resolution 8 nm, optical resolution 12 nm). Sensor integration time was 600 ms. The device was equipped with quartz protection to prevent dirt accumulation. Four spectra were taken for each sample—i.e. two spectra per sub-sample—and each spectrum was the mean of 10 scans with a lamp warm-up time of 45 seconds. These measurements were performed after monochromator analysis, removing the ground samples from the circular cup.

2.3. Data analysis

Spectral repeatability was evaluated using the Root Mean Square (RMS) statistic, calculated as the averaged root mean square of differences between replicates of the spectral values [19]. Zamora-Rojas et al. [17] have recommended a cut-off value of $11250 \mu\log(1/R)$ for ground pork analyzed in a NIRS scanning monochromator. Replicates with large RMS in both instruments were removed. Of the remaining spectra, the average spectrum of each sample was used for further calculations.

Since the FNS and MEMS-NIRS spectrometers differ both in wavelength range and in spectral wavelength interval step, a shape-preserving piecewise cubic interpolation aimed at preserving convexity to scattered convex data was used to trim the NIRS scanning monochromator range to the 100 wavelengths of the MEMS-NIRS device [12]. After trimming and interpolating, three standardization algorithms were evaluated for each standardization sub-group: the Direct Standardization (DS) algorithm [20], the Piecewise Direct Standardization (PDS) algorithm [21], and the Spectral Differences at each Wavelength (SDW) correction [12]. The first two procedures are based on the construction of a transformation matrix using standardization samples measured in both instruments. That matrix, calculated using a local Partial Least Squares (PLS) regression model for each wavelength of the master instrument and the corresponding wavelength on the slave instrument, was used to transform slave-measured spectra to the master instrument—i.e. to transfer the database from the FNS (slave) to the MEMS-NIRS device (master); MEMS-NIRS instrument has been selected as the master to simplify future NIR analysis—at user level—with this instrument, avoiding the use of a correction (standardization) for every single spectrum taken to look like spectra recorded in the FNS. In the case of the PDS algorithm, local multivariate models were computed for each spectral window around a given wavelength; this required optimization of the window size (ranging from 3 to 31) and of the number of latent variables used in each PLS model. The third procedure (SDW) involved adding to the slave instrument (FNS) the difference, at each wavelength, between

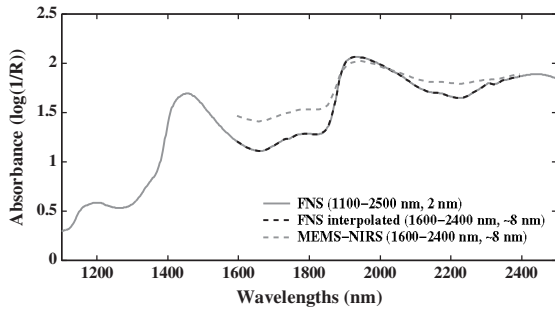


Fig. 1. Average spectra for ground pork samples measured with FNS and MEMS-NIRS devices.

the values of the average spectrum of the standardization set measured on MEMS-NIRS and the mean spectrum of the same samples measured on the FNS. The Root Mean Square Error (RMSE), calculated as the average of the absorbance differences for each wavelength before and after the application of the different standardization algorithms (DS, PDS and SDW) and procedures, was evaluated for each sample in the validation-test set (V_{spe}) to check standardization performance spectrally.

Once the best standardization procedures had been selected and the database had been transferred, multivariate quantitative models based on the Modified Partial Least Squares (M-PLS) algorithm for the prediction of fat, moisture and protein composition were constructed using the MEMS-NIRS spectrometer. Since the original database (set O , comprising 342 samples) came from a FNS instrument, the models constructed using that database, as published by Zamora-Rojas et al. [17], were taken as the starting-point for comparing the quantitative results of standardization. Thus, spectrum pre-processing, calibration development and statistical evaluation performed with the original database were evaluated against the transferred database. The following statistics were used to select the best models: Standard Error of Calibration (SEC), Standard Error of Cross-Validation (SECV), Determination Coefficient of Cross-Validation (R^2_{cv}) and Residual Predictive Deviation (RPD). The Standard Error of Prediction (SEP) derived from the validation of set V_{pre} (60 samples) was also used to compare calibration transfer performance, together with the statistics Global Mahalanobis distance (GH) (distance between a sample and the center of the calibration set) and Neighbor Mahalanobis distance (NH) (distance between any sample and the most similar sample in the calibration set).

Table 1
Statistics for M-PLS models to predict fat, moisture and protein using FNS instrument.

Parameter	Range (nm)/wavelength interval (nm)	Mean (%)	SD (%)	No. PLS factors	SEC (%)	SECV (%)	R^2_{cv}	RPD _{cv}	SEP (%)	GH	NH
Fat	*1100–2500/2	7.03	3.51	6	0.34	0.35	0.99	10.02	0.44 ⁺	0.80 ⁺	0.46 ⁺
	1600–2400/2	6.82	3.30	6	0.32	0.33	0.99	10	0.38 ⁺	1.07 ⁺	0.31 ⁺
	1600–2400/~8	6.71	3.21	12	0.37	0.38	0.99	8.44	0.50 ⁺	1.14 ⁺	0.27 ⁺
Moisture	*1100–2500/2	70.07	3.35	7	0.44	0.46	0.97	7.28	0.38 ⁺	0.80 ⁺	0.46 ⁺
	1600–2400/2	70.51	2.71	5	0.44	0.45	0.97	6.02	0.48 ⁺	1.07 ⁺	0.31 ⁺
	1600–2400/~8	70.51	2.72	12	0.43	0.45	0.97	6.04	0.63 ⁺	1.14 ⁺	0.27 ⁺
Protein	*1100–2500/2	21.52	1.68	7	0.49	0.52	0.90	3.23	0.76 ⁺	0.80 ⁺	0.46 ⁺
	1600–2400/2	21.49	1.67	7	0.49	0.52	0.90	3.21	0.68 ⁺	1.07 ⁺	0.31 ⁺
	1600–2400/~8	21.51	1.67	5	0.61	0.62	0.86	2.69	0.55 ⁺	1.14 ⁺	0.27 ⁺
								2.57 [^]	30.91 [^]	23.00 [^]	

All models were pre-treated with SNV + DT (1, 10, 5, 1). SD: Standard Deviation; SEC: Standard Error of Calibration; SECV: Standard Error of Cross-Validation; R^2_{cv} : Determination Coefficient of Cross-Validation; RPD: Residual Predictive Deviation; SEP: Standard Error of Prediction; GH: Global Mahalanobis distance; NH: Neighbor Mahalanobis distance (SEP, GH and NH values were calculated with validation set V_{pre} comprising 60 samples).

*Published by Zamora-Rojas et al. [17].

+ Spectra measured on FNS instrument.

[^]Spectra measured on MEMS-NIRS device.

WinISI software (Infrasoft International, Port Matilda, PA, USA) was used for spectral repeatability evaluation and for calibration development. MATLAB ver 7.6 (The MathWorks, Natick, USA) was used for calibration transfer calculations (trimming, interpolating and SDW). PLS Toolbox (Eigenvector Research, Manson, USA) was used for DS and PDS algorithms.

3. Results and discussion

The first point to highlight is the difference in spectral range and wavelength interval between instruments (Fig. 1). In order to evaluate the influence of instrumental design differences, M-PLS models were constructed using the FNS and the database (set O) over the wavelength range common both to the FNS and the MEMS-NIRS instrument (1600–2400 nm) and also using the same wavelength interval (a non-constant step of around 8 nm). The results are shown in Table 1. Results on the FNS for accuracy and performance when the wavelength range was trimmed to 1600–2400 nm were similar, for all three chemical parameters, to those reported by Zamora-Rojas et al. [17] using the 1100–2500 nm range. When the 400 wavelengths of the FNS in the 1600–2400 nm range were interpolated to the 100 wavelengths of the MEMS-NIRS device, the models constructed using the NIRS scanning monochromator displayed a larger number of PLS factors, except in the case of protein, and a drop in accuracy. SEP values were 0.5% for fat, 0.63% for moisture and 0.55% for protein using measurements performed on the FNS instrument with the trimmed and interpolated M-PLS models (Table 1). This represents an increase of 0.06% and 0.25% in the SEP values of set V_{pre} compared to the reference models (range 1100–2500 nm, wavelength interval 2 nm) for fat and moisture, respectively. However, in the case of protein the SEP was lower in the trimmed and interpolated FNS model compared to the one selected as reference. These results indicate that the spectral range and wavelength interval can influence the model's predictive ability. The unstandardized trimmed and interpolated models constructed using the FNS spectrometer were not suitable for spectra measured on the MEMS-NIRS instrument. The SEP values obtained were 4.34% for fat, 0.63% for moisture and 2.57% for protein, indicating that the moisture parameter—unlike the other two—may not require standardization. Nevertheless, the Global Mahalanobis distance (GH) and Neighbor Mahalanobis distance (NH) indicated major differences between FNS database spectra and MEMS-NIRS spectra (GH = 30.91 and NH = 23.00, respectively) probably due to the lack of wavelength accuracy and absorbance scale changes, confirming the need for standardization.

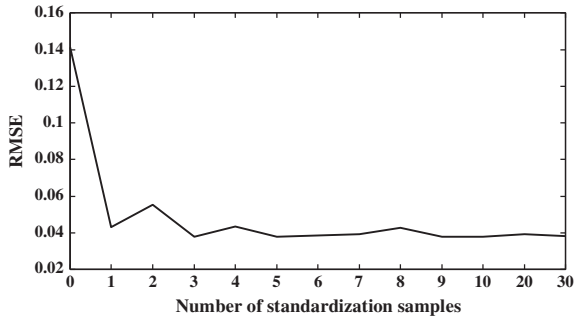


Fig. 2. Average Root Mean Square Error (RMSE) values for spectral differences before and after SDW standardization for the validation set V_{spe} (205 samples) based on the number of standardization samples used.

After trimming and interpolation, the various standardization strategies were evaluated using the sub-groups formed for that purpose. The SDW algorithm calculated the difference between the mean spectrum of the standardization sub-group measured in the handheld MEMS-NIRS instrument and the mean spectrum of the same samples measured in FNS. This was done for each standardization sub-group, and the differences were added to each spectrum measured on the FNS to obtain the standardization validation-test set V_{spe} (205 samples) as on the MEMS-NIRS spectrometer. Fig. 2 shows the average RMSE values calculated as the mean of all the RMSE tests performed, by wavelengths, for the SDW algorithm, depending on the number of standardization samples used. The use of 5 standardization samples yielded the minimum RMSE value (0.0377), indicating that 5 samples measured in both instruments may be enough to ensure a successful calibration transfer. DS and PDS were also evaluated. DS recorded a minimum average RMSE value using 4 standardization samples, while PDS required 10 standardization samples with a window size of 7 wavelengths (influence of different number of standardization samples in the DS and PDS algorithms not shown).

RMSE values for each wavelength before and after application of the best transfer parameters for each standardization algorithm evaluating the V_{spe} set measured in both instruments are shown in Fig. 3. The results indicated considerable differences in spectra between FNS and MEMS-NIRS; however, those differences were reduced using either of the standardization algorithms with the optimized number of samples (SDW with 5 standardization samples, DS with 4 standardization samples or PDS with 10 standardization samples). Although these results confirmed that standardization successfully reduced spectral differences between instruments for the validation-test set V_{spe} (Fig. 4a), when the three algorithms were applied to the large database (set O) constructed over several

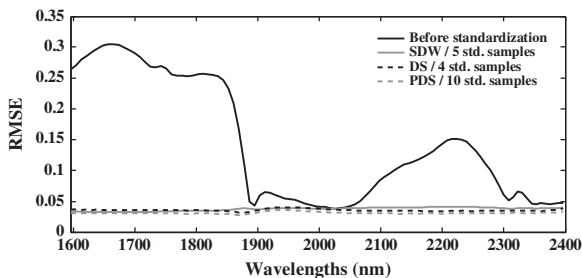


Fig. 3. Root Mean Square Error (RMSE) values for each wavelength before and after the application of the different standardization algorithms evaluated for the validation set V_{spe} (205 samples). std. samples = number of standardization samples.

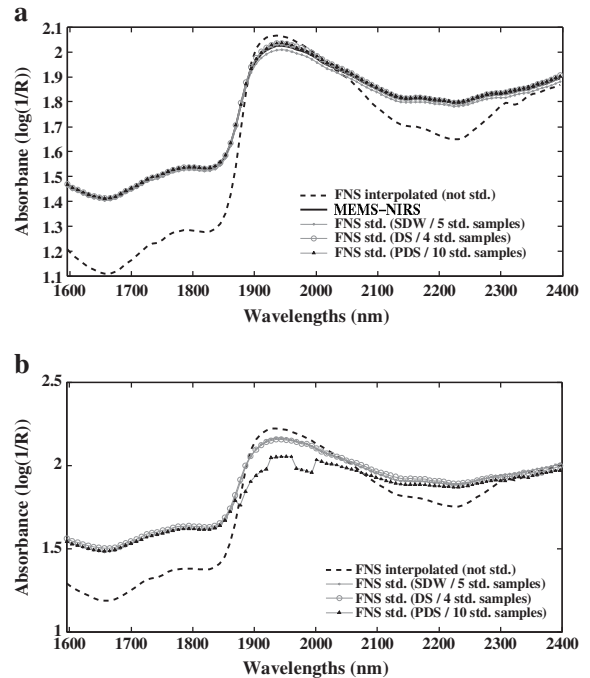


Fig. 4. Mean spectra of the standardization validation set V_{spe} (205 samples) (a) and the original calibration database O (342 samples) (b) before and after the application of the different standardization algorithms. not std. = unstandardized; std. = standardized; std. samples = number of standardization samples.

years using the FNS instrument, each strategy performed differently. Fig. 4b shows average spectra for the database O before (trimmed and interpolated FNS) and after application of the three standardization strategies. It is observed that SDW and DS strategies performed well, while the PDS algorithm displayed jumps at certain wavelengths, which modified spectral shape, thus indicating poor calibration transfer. These are observations based on the average spectra for all the samples of the database O , but a detailed analysis showed that the DS method proved unacceptably noisy, particularly at longer wavelengths, for individual samples especially for those collected at much earlier stages.

These visual results were borne out by the fact that calibration models constructed using the PDS transfer matrices wholly lacked statistical significance and accuracy. Although the strategy worked well for the transfer of the 205 samples of the V_{spe} set measured at the same time in both instruments (Fig. 4a), it failed to work when samples measured in the NIRS monochromator in earlier years were transferred (Fig. 4b). This may be because samples measured in FNS at earlier periods underwent spectral changes due to instrumentation-related issues, moisture-sensitive sample conditions and other factors [17] known to affect the performance of meat-database standardization. Gemperline et al. [22] also indicated that these discontinuities in the PDS transferred spectra can be due to swap of eigenvalues that are similar in magnitude between adjacent windows what produce different models in neighboring windows. The discontinuities were particularly apparent with large time-lapse: samples from database O collected in 2009—i.e. a date close to the standardization-set collection date—were transferred correctly, while samples collected in 1999, 2000 or 2001 were not (not shown). It should be also mentioned that using a standardization set built with only samples from 2010 can have a risk of lack of robustness of the calibration transfer for samples of earlier periods as it is observed in the results.

Table 2
Statistics for M-PLS models to predict fat, moisture and protein transferred to the MEMS-NIRS device (1600–2400 nm with a non-constant step of around 8 nm).

Parameter	Standardization	Mean (%)	SD (%)	No. PLS factors	SEC (%)	SECV (%)	R^2_{cv}	RPD _{cv}	SEP (%)	GH	NH
Fat	DS method / 4 std. samples	6.53	2.88	3	0.61	0.61	0.96	4.72	0.59 [^]	2.43 [^]	0.09 [^]
	SDW method / 8 std. samples	6.66	3.15	13	0.37	0.39	0.98	8.08	0.72[^]	0.96[^]	0.28[^]
Moisture	DS method / 4 std. samples	70.40	2.75	4	1.62	1.64	0.64	1.67	9.33 [^]	2.43 [^]	0.09 [^]
	SDW method / 8 std. samples	70.48	2.73	12	0.44	0.47	0.97	5.81	0.73[^]	0.96[^]	0.28[^]
Protein	DS method / 4 std. samples	21.56	1.62	3	1.38	1.38	0.28	1.17	1.16 [^]	2.43 [^]	0.09 [^]
	SDW method / 8 std. samples	21.50	1.66	5	0.62	0.66	0.85	2.51	0.66[^]	0.96[^]	0.28[^]

All models were pre-treated with SNV + DT (1,10,5,1). SD: Standard Deviation; SEC: Standard Error of Calibration; SECV: Standard Error of Cross-Validation; R^2_{cv} : Determination Coefficient of Cross-Validation; RPD: Residual Predictive Deviation; SEP: Standard Error of Prediction; GH: Global Mahalanobis distance; NH: Neighbor Mahalanobis distance (SEP, GH and NH values were calculated with validation set V_{pre} comprising 60 samples). [^]Spectra measured on MEMS-NIRS device. Bold values indicate the best transferred models.

The DS algorithm showed a noisy tendency at longer wavelengths when applied to the calibration set O (342 samples from different years). This tendency was most marked for samples collected at a much earlier stage, presumably for the reasons suggested above for PDS. The models obtained using the DS method and 4 standardization samples (this being the number yielding the lowest RMSE values for spectral differences between instruments) are shown in Table 2. The results suggest that the models obtained were not suitable for screening purposes in meat analysis, and especially for moisture or protein prediction, given that SEP values (9.33% and 1.16%, respectively) were larger than those shown in Table 1 and showed low R^2_{cv} (0.64 and 0.28, respectively). However, the models displayed acceptable predictive ability for the fat parameter (SEP = 0.59%).

The Spectral Differences by Wavelength (SDW) algorithm yielded a different pattern. Spectra transferred both from the validation set and from the calibration database retained their shape for all samples; as the mean spectrum for the calibration set O shows (Fig. 4a–b), but also a detailed individual analysis of the samples. This suggests that the SDW strategy is more robust than the other methods when is applied to samples measured at an earlier stage than the standardization set used.

This method was applied to each standardization sub-group, evaluating the original database O in each case. A transferred database was thus constructed individually with the added differences calculated for each standardization sub-group. To evaluate the performance of the transferred models, the validation set V_{pre} (60 samples) measured on the MEMS-NIRS device was predicted using each model and SEP values for each analytical parameter were calculated. SEP values calculated for each transferred model, depending on the number of standardization samples used for the SDW algorithm, are shown in Fig. 5. Prior to standardization, SEPs were 4.34% for fat, 0.63% for moisture and 2.57% for protein; GH and NH were also very high (Table 1). However, SEP, GH and NH values were all reduced using the SDW method with 8 standardization samples (Table 2). Although 5 standardization samples yielded the best RMSE values

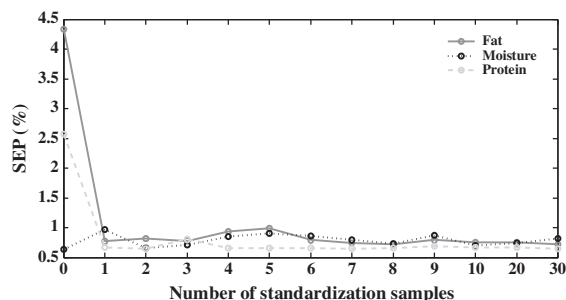


Fig. 5. Standard Error of Prediction (SEP) of the validation set V_{pre} (60 samples) measured on the MEMS-NIRS device for predicting chemical composition using the SDW-transferred models.

for mean spectra measured in the two instruments using SDW, the best SEP values were obtained using a standardization sub-group of 8 samples (0.72%, 0.763% and 0.66% for fat, moisture and protein, respectively), which also provided a suitable spectral fitting as demonstrated by GH and NH values (0.96 and 0.28, respectively; Table 2). A similar study performed to transfer a large feed (heterogeneous product) database from a FNS instrument to a MEMS-NIRS device used 14 standardization samples, although no attempt was made to optimize that number [12].

The SEP results obtained (Fig. 5) indicated that the prediction of moisture was not greatly improved using transferred rather than untransferred models; however, calibration transfer successfully reduced errors, especially GH and NH statistics, for fat and protein prediction. The statistics for the best transferred model (SDW/8 standardization samples) indicated greater accuracy than that obtained using the FNS models over the same wavelength range and interval as the MEMS-NIRS instrument without being transferred for predicting samples measured on the handheld device (Table 1). Moreover, the GH and NH statistics indicated good spectral matching with the library when standardization was performed by SDW, dropping from 30.91 (GH) and 23.00 (NH) to 0.78 (GH) and 0.26 (NH) for the MEMS-NIRS spectra of the validation set V_{pre} .

Although the performance of the transferred models (Table 2) proved slightly less accurate than the at-line models developed for the NIRS scanning monochromator (Table 1), they are still suitable for meat analysis. Moreover, the slight loss in accuracy is more than offset by the practical and technical advantages afforded by the handheld MEMS-NIRS spectrometer, which enables in-situ analysis with readily-available results for each individual sample. Moreover, sample presentation is easier—there is no need to fill the cup, as required by the monochromator—and analysis is faster; the FNS requires over 1 minute per subsample, while the MEMS-NIRS device requires only 2 seconds. Additionally, the MEMS-NIRS instrument is cheaper, and minimal staff training is required for routine analysis. The MEMS-NIRS instrument is thus highly suitable for meat industrial applications. Finally, model accuracy is likely to be improved when new samples analyzed directly in the MEMS-NIRS instrument are included in the database.

4. Conclusions

The Spectral Differences by Wavelength method (SDW) performed better than the other strategies tested for transferring quantitative models for the prediction of fat, moisture and protein composition in ground pork samples from a NIRS scanning monochromator to a handheld MEMS-NIRS instrument. Eight standardization samples were sufficient for standardization purposes. This study showed that large databases containing important sample spectra collected over several years can successfully be transferred to new devices that are more suitable for in-situ analysis at industrial level.

Acknowledgments

The authors are grateful for financial support from the Research Project INIA "FIT 2006-060000", Research Excellence Program of the Andalusian Regional Government (Project no. P09-AGR-5129), co-financed by ERDF funds (1FD1997-1252-CO-02 and IFD1997-0990), and also to the Iberian pig producers AECERIBER, COVAP S.C.A. and S.A.T. Vallehermoso for providing the experimental materials. Thanks are also given to technical staff at the Department of Animal Production (Manuel Sánchez-Calderón, Antonio López-López and María del Carmen Fernández-Fernández). Some of the analyses were carried out at the SCAI "NIR/MIR Spectroscopy Unit" at the University of Córdoba. We would also like to thank Dr. Pierre Dardenne for providing the interpolation function used in this study. EZR is a fellow of the "Training of University Teachers" Program (Formación del Profesorado Universitario, FPU. AP2008-00838) and acknowledges the financial support of the Spanish Ministry of Education.

References

- [1] M. Prevolnik, M. Candek-Potokar, D. Skorjanc, Ability of NIR spectroscopy to predict meat chemical composition and quality—a review, *Czech Journal of Animal Science* 49 (11) (2004) 500–510.
- [2] H. Huang, H. Yu, H. Xu, Y. Ying, Near Infrared spectroscopy for on/in-line monitoring of quality in foods and beverages: a review, *Journal of Food Engineering* 87 (2008) 303–313.
- [3] N. Prieto, R. Roehe, P. Lavín, G. Batten, S. Andrés, Application of near infrared reflectance spectroscopy to predict meat and meat products quality: a review, *Meat Science* 83 (2009) 175–186.
- [4] J. Weerananatanaphan, G. Downey, P. Allen, D.W. Sun, A review of near infrared spectroscopy in muscle food analysis: 2005–2010, *Journal of Near Infrared Spectroscopy* 19 (2011) 61–104.
- [5] R. Crocombe, MEMS technology moves process spectroscopy into a new dimension, *Spectroscopy Europe* 16 (2004) 16–19.
- [6] P. Dardenne, Calibration transfer in near infrared spectroscopy, *NIRS News* 13 (4) (2002) 3–7.
- [7] J.S. Shenk, J.J. Workman, M.O. Westerhaus, Application of NIR spectroscopy to agricultural products, in: D.A. Burns, E.W. Ciurczak (Eds.), *Handbook of near-infrared analysis*, 3rd edition, CRC Press, USA, 2008, pp. 347–386.
- [8] T. Fearn, Standardisation and calibration transfer for near infrared instruments: a review, *Journal of Near Infrared Spectroscopy* 9 (2001) 229–244.
- [9] R.N. Feudale, N.A. Woody, H.W. Tan, A.J. Myles, S.D. Brown, J. Ferre, Transfer of multivariate calibration models: a review, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 64 (2002) 181–192.
- [10] D.R. Day, M.A. Butler, M.C. Smith, A. McAllister, E.R. Deutsch, K. Zafriou, S.D. Senturia, Diffractive-MEMS implementation of a Hadamard near-infrared spectrometer. TRANSDUCERS'05, *The 13th International Conference on Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems*, Seoul, Korea, Institute of Electrical and Electronics Engineer (IEEE), Piscataway, NJ, USA, 2005, pp. 1246–1249.
- [11] D. Pérez-Marín, M.T. Sánchez, P. Paz, M.A. Soriano, J.E. Guerrero, A. Garrido-Varo, Non-destructive determination of quality parameters in nectarines during on-tree ripening and postharvest storage, *Postharvest Biology and Technology* 52 (2) (2009) 180–188.
- [12] J.A. Fernández-Pierna, P. Vermeulen, B. Lecler, V. Baeten, P. Dardenne, Calibration transfer from dispersive instruments to handheld spectrometers, *Applied Spectroscopy* 64 (6) (2010) 644–648.
- [13] D. Pérez-Marín, P. Paz, J.E. Guerrero, A. Garrido-Varo, M.T. Sánchez, Miniature handheld NIR sensor for the on-site non-destructive assessment of post-harvest quality and refrigerated storage behaviour in plums, *Journal of Food Engineering* 99 (3) (2010) 294–302.
- [14] N. Prado, V. Fernández-Ibáñez, P. González, A. Soldado, On-site NIR spectroscopy to control the shelf life of pork meat, *Food Analytical Methods* 4 (4) (2011) 582–589.
- [15] E. Zamora-Rojas, D. Pérez-Marín, E. De Pedro-Sanz, J.E. Guerrero-Ginel, A. Garrido-Varo, In-situ classification of Iberian pig carcasses using MEMS-NIRS technology, *Meat Science* 90 (3) (2012) 636–642.
- [16] D. Pérez-Marín, A. Garrido-Varo, J.E. Guerrero, Remote near infrared instrument cloning and transfer of calibrations to predict ingredient percentages in intact compound feedstuffs, *Journal of Near Infrared Spectroscopy* 14 (2006) 81–91.
- [17] E. Zamora-Rojas, A. Garrido-Varo, E. De Pedro-Sanz, J.E. Guerrero-Ginel, D. Pérez-Marín, Monitoring NIRS calibrations for use in routine meat analysis as part of Iberian pig-breeding programs, *Food Chemistry* 129 (4) (2011) 1889–1897.
- [18] J.S. Shenk, M.O. Westerhaus, Population structuring of near infrared spectra and modified partial least squares regression, *Crop Science* 31 (1991) 1548–1555.
- [19] M.L. Martínez, A. Garrido, E.J. De Pedro, L. Sánchez, Effect of sample heterogeneity on NIR meat analysis: the use of the RMS statistic, *Journal of Near Infrared Spectroscopy* 6 (1998) 313–320.
- [20] Y. Wang, D.J. Veltkamp, B.R. Kowalski, Multivariate instrument standardization, *Analytical Chemistry* 63 (1991) 2750–2756.
- [21] Y. Wang, M.J. Lysaght, B.R. Kowalski, Improvement of multivariate calibration through instrument standardization, *Analytical Chemistry* 64 (1992) 562–564.
- [22] P.J. Gemperline, J.H. Cho, P.K. Aldridge, S.S. Sekulic, Appearance of discontinuities in spectra transformed by the piecewise direct instrument standardization procedure, *Analytical Chemistry* 68 (1996) 2913–2915.

5.5. Caracterización óptica y simulación de la propagación de la radiación NIR en tejido cutáneo y adiposo porcino

El interés por el análisis no destructivo de productos agroalimentarios intactos o, más relacionado con el marco de esta tesis doctoral, el análisis intacto de canales o animales vivos hace que sea necesario en una primera etapa científica caracterizar los tejidos con los que la radiación interactúa. Esto es así ya que, normalmente, la capa o tejido de interés en medidas no destructivas no está en la superficie del producto, sino que se encuentra en capas o tejidos más interiores, por lo que resulta imprescindible entender como interacciona la radiación NIR en el tejido y cuál es su profundidad de penetración. Por todo ello, son necesarios estudios de investigación básica que caractericen los tejidos de interés y el desarrollo de modelos de simulación para entender los factores que afectan a esa propagación de la luz.

En esta sección, se muestran y discuten los resultados referentes a la caracterización óptica de tejido procedente de cerdo ibérico cutáneo (5.5.2) y adiposo (5.5.1); así como la simulación de la propagación de la radiación NIR a través de la piel para medidas de reflectancia en porcino en función de la distancia entre la fuente de luz y el detector (5.5.3).



**DOUBLE INTEGRATING SPHERES
MEASUREMENTS FOR ESTIMATING OPTICAL
PROPERTIES OF PIG SUBCUTANEOUS
ADIPOSE TISSUE**

5.5.1. Double integrating spheres measurements for estimating optical properties of pig subcutaneous adipose tissue

Eduardo Zamora-Rojas^{1*}, Ben Aernouts², Ana Garrido-Varo¹, Dolores Pérez-Marín¹, José Emilio Guerrero-Ginel¹ and Wouter Saeys²

¹ Department of Animal Production, Non-Destructive Spectral Sensor Unit, Faculty of Agricultural and Forestry Engineering, University of Córdoba, Agrifood Campus of International Excellence (ceiA3), Campus Rabanales, N-IV, km 396, Córdoba, 14014, Spain.

² Department of Biosystems, Division of Mechatronics, Biostatistics and Sensors, University of Leuven, Kasteelpark Arenberg 30, Leuven, 3001, Belgium.

* Corresponding author: e.zamora@uco.es

Abstract

Optical properties of pig subcutaneous adipose tissue were estimated using double integrating sphere (DIS) measurements in combination with an inverse adding doubling (IAD) light propagation model. Total reflectance, total transmittance and unscattered transmittance were measured for the wavelength range 1150-2250 nm with 10 nm resolution. These measurements were used to estimate the bulk optical properties (absorption coefficient, scattering coefficient and anisotropy factor) of 10 iberian pig adipose tissue samples. The estimated absorption coefficient spectra were dominated by water and lipid absorption bands, the main chemical components of the adipose tissue. These values showed a suitable match with the theoretical values calculated based on the average composition of the tissue. The obtained scattering coefficient spectra showed a smooth decrease with increasing wavelength, which is typical for biological tissues. The anisotropy factor spectra of adipose tissue were obtained, which describe the angular scattering pattern, instead of using a fixed value for the estimation procedure. The optical characterization described in this paper is crucial for a better understanding of the impact of pure absorption and scattering on the NIR spectra collected by a single measurement in the laboratory, process line at the slaughterhouse or on the farm. Moreover, the estimated data reported in this study would promote a more efficient sensor design and data processing optimization.

Keywords: Optical properties; Scattering; Absorption; Double integrating spheres, Inverse adding-doubling; Near-infrared; Adipose tissue; Pig.

1. Introduction

Agrifood products with a high added value such as pig dry-cured meat (e.g. iberian dry-cured hams) require specified labelling and grading systems based on several international and national standards. The production system and feeding regime of the animals have a big impact on the quality of the derived meat products, especially in some breeding such as iberian pigs, resulting in different market prices. Therefore, there is a general interest in objective methods or techniques that allow for an accurate, fast, economical, simple and non-destructive detection of the physical and chemical properties of meat products in order to determine their quality and, therefore, certify their commercial category.

Near-Infrared Reflectance Spectroscopy (NIRS) has been widely studied for these purposes in the meat industry (Prevolnik et al., 2004; Prieto et al., 2009; Weeranantaphan et al., 2011). Several researchers have reported that NIRS analysis of melted fat in laboratory conditions can provide accurate information on the fatty acid profile (De Pedro et al., 1992; García-Olmo, et al., 2001; Garrido-Varo et al., 2004; Fernández-Cabanás et al., 2007; Pérez-Marín et al., 2007, 2010) or classify the pork meat products according to their feeding regimes (Hervás et al., 1994; De Pedro et al., 1995, García-Olmo et al., 2009). However, the analysis of intact subcutaneous adipose tissues in the laboratory, on the carcass on the slaughterhouse or on living animals with the aim of on-line/*in-situ* non-destructive automatic grading has so far shown a loss of performance of the predictive models (Pérez-Marín et al., 2009; Pérez-Juan et al., 2010; Zamora-Rojas et al., 2012). This is mainly due to the increased complexity of the sample matrix and the light scattering related to that, although other factors may influence such as number of samples, variability of the sample set, instrument characteristics, etc.

When NIRS reflectance is measured on adipose tissue of pig carcasses, the captured light is highly scattered by the complex structure of the adipose tissue (adipose cells, cell membrane, cell organelles, intercellular spaces, etc.). Moreover, if the measurement is performed on the skin of living pigs, the light has to travel through the skin before it reaches the layer of interest: the subcutaneous adipose tissue. The pork skin consists of three major layers with different structures: epidermis (blood free layer), dermis (vascularised layer with dense irregular connective tissue with collagenous fibres) and hypodermis (subcutaneous adipose tissue layer composed of two sub-layers separated by thin connective tissue) (Renaudeau et al., 2006). Each of these layers has an influence on the collected signal, obscuring the chemical information on the composition of the adipose tissue layer. As stated earlier, this could result in a reduced performance of the predictive models. Therefore, innovative NIRS sensors which are able to correct for intervening signals, such as absorption by other layers and scattering, are needed in order to obtain a high accuracy. Knowledge of the bulk optical properties (i.e. absorption

coefficient (μ_a), scattering coefficient (μ_s) and anisotropy factor (g)) and the potential range of these properties for the representative tissue layers (both layer(s) of interest and intervening layer(s)) would promote a more efficient sensor design, data processing and interpretation (Inio et al., 2003; Arimoto et al., 2005).

Little information is available on the optical properties of subcutaneous adipose tissue (Bashkatov et al., 2005a and 2005b; Salomatina et al., 2006), with no references to porcine subcutaneous adipose tissue. Moreover, due to a lack in good separation between absorption and scattering, the added value of the reported optical properties on adipose tissues is rather limited. The porcine subcutaneous adipose tissue is, however, very important for quality control in pork products, especially in iberian pig products since changes in fat composition due to feeding regime, breed and/or rearing conditions can have a significant effect on the payment to producers and product prices (Zamora-Rojas et al., 2012).

Double integrating spheres (DIS) measurements are recognized as the “golden standard” for *in vitro* optical characterization of turbid and complex media such as biological tissues (Pickering et al., 1993; Prahl, 2010, Bashkatov et al., 2011). A DIS setup allows measuring the total reflectance and total transmittance simultaneously, providing more robust and accurate measurements compared to single integrating sphere measurements.

However, the bulk optical properties cannot be derived directly from DIS measurements, but have to be estimated through iterative inversion of light propagation model. The Radiative Transfer Equation (RTE) describes photon propagation in scattering and absorbing media for single scattering events, based on the optical properties of the medium (Martelli, 2012). To solve the RTE for multiple scattering samples like biological tissues, several approaches have been proposed (Tuchin, 2007; Bashkatov et al., 2011). Among them, the Adding Doubling (AD) method calculates the total reflectance and transmittance very accurate, while it is still flexible (supports full optical property range, takes into account boundary conditions, etc.) and time efficient. In the AD method, the RTE is used to calculate the total reflectance and transmittance for a single ‘infinitesimally’ thin sample layer. This layer is then ‘doubled’ and the reflectance and transmittance of the doubled layer is calculated. This process of doubling is repeated until the desired thickness of the homogeneous sample is reached. Different layers (e.g. glass slides, etc.) can be ‘added’, together with their contributions, taking into account internal reflections at the boundaries. As the AD method calculates the reflectance and transmittance for a tissue layer with known bulk optical properties, it has to be inverted to allow extraction of the bulk optical properties (μ_a and μ_s) from DIS measurements. Most common inverse AD (IAD) algorithms estimate the optical properties by iteratively changing their values in the AD simulations

until the simulated reflectance and transmittance values match with the measured ones (Saeys et al., 2008; Prahl, 2010).

Therefore, the present study aimed to obtain highly accurate bulk optical properties for pork subcutaneous adipose tissue in the wavelength range from 1150 to 2250 nm, a relevant range for fat content information, using an inverse-adding doubling algorithm for double integrating spheres measurements. Moreover, most of the published optical properties estimations are based on a fixed guess of the anisotropy factor (g) influencing the scattering coefficient spectra. Therefore, in this study, DIS measurements were combined with unscattered (collimated) transmittance measurements in the IAD routine to extract all three optical properties (μ_a , μ_s and g) for the full wavelength range.

2. Materials and methods

2.1. Sample set

Ten iberian pig tissue samples, obtained post-mortem at a Spanish slaughterhouse, were used for *in vitro* DIS measurements. Skin samples were collected 10 cm below the tail insertion area. The samples were frozen by liquid nitrogen in the laboratory and kept at -20°C until 24 hours before the analysis. Skin (epidermis and dermis) was removed from the sample before cutting the subcutaneous adipose layer in thin slices of 550 μm and 1100 μm thickness using a cryotome (Microm HM 560, Prosan) at -10°C . In both cases, the sample diameter was 30 mm. Immediately before analysis, samples were placed in a cuvette and a droplet of biological water (0.9 % NaCl) was added to reduce the refractive index mismatch between glass and sample.

2.2. Double integrating spheres and unscattered transmittance measurements

A DIS and unscattered transmittance measuring system, composed of a novel wavelength tuneable spectroscopic setup (Wang et al., 2012), was designed to acquire total reflectance (M_R), total transmittance (M_T) and unscattered/collimated transmittance (M_U) spectra (Figure 1). A high power (4 Watt) 460–2400 nm supercontinuum laser (SC450-4, Fianium Ltd., Southampton, UK) was used as light source to obtain a high signal to noise ratio (SNR) for DIS measurements on biological tissues above 1300 nm. A high precision monochromator (Oriel Cornerstone™ 260X, Newport, Irvine, US) working in the wavelength range 450–2800 nm diffracted the laser light into the different wavelengths studied, with an interval step of 10 nm. After collimating the light coming out of the monochromator, a long pass optical filter with a cut-off wavelength of 1150 nm blocked the higher order diffracted light from the grating. To correct for instabilities of the laser, the beam was split (50/50 beam splitter, Thorlabs Inc., New Jersey, USA) into a reference beam and sample beam. The reference beam was focused on a 1 mm diameter

InGaAs detector (PDA10DT-EC, Thorlabs Inc., New Jersey, USA), while the collimated sample beam was focused by a lens ($f = 30$ cm) on the sample. The sample was mounted in a sample holder (size: 45×45 mm²), located between the two gold-coated integrating spheres (RT-060-IG, Labsphere, Inc., North Sutton, US. Wavelength range: 700-20000 nm; inner diameter: 6 inch) with a sample and detector port diameter of 1 and 0.5 inch, respectively. The tissue

layers were sandwiched between two optical borosilicate glass slides (1.1 mm wall thickness) separated by a spacer of 550 μ m or 1100 μ m (pathlength). Two-stage TE-cooled 3 mm diameter enhanced InGaAs detectors (G5853-23, Hamamatsu, Japan) were mounted on the two spheres to measure the total reflected and total transmitted light signals. Internal baffles were located between the sample and the detectors to prevent measuring directly reflected or transmitted light. For obtaining the unscattered transmittance measurements, a flip-mirror was used to change the sample beam path after the beam splitter and send the light to the sample holder located in front of another enhanced InGaAs detector (PDA10DT-EC, Thorlabs Inc., New Jersey, USA). A neutral density filter (NDF, Qioptiq, Luxembourg) of optical density 3.0 was used as a reference in the unscattered transmittance setup to prevent detector saturation during system calibration.

The methodology described by Prahl (2010) was followed for instrumental calibration and sample analysis. Automatic control of the system (laser, monochromator and detectors) was obtained with a purpose-designed program in LabView 8.5 (National Instruments, Austin, TX).

2.3. Optical properties estimation

A MATLAB (ver 7.10, The Mathworks Inc., Massachusetts, USA) code was designed to calculate M_R , M_T and M_U from the DIS and unscattered transmittance measurements. From these measurements, the absorption coefficient (μ_a), reduced scattering coefficient () and anisotropy factor (g) were estimated using the IAD program provided by Prof. Scott Prahl at the Oregon Laser Research Center (Prahl, 2010). To solve the inverse problem, the knowledge of the refractive index of the sample is required in order to correct for internal reflection at the boundaries. The wavelength dependent

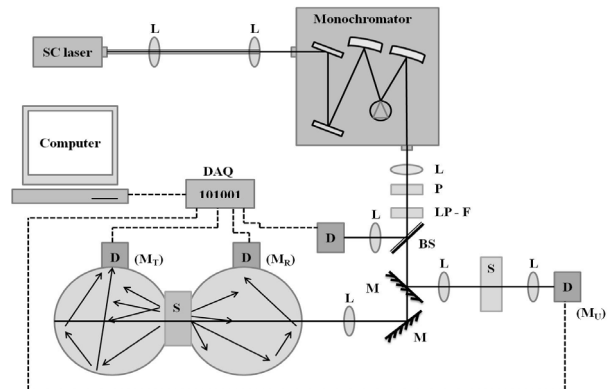


Figure 1. Schematic diagram of the DIS system. SC: super-continuum; L: lens; P: polarizer; LP-F: long pass filter; BS: beam splitter; M: mirror; D: detector; S: sample holder; DAQ: Data acquisition card.

refractive index values were calculated with the Cauchy dispersion equation proposed by Cheng et al. (2002) for porcine adipose tissue:

$$n(\lambda) = A + B\lambda^{-2} + C\lambda^{-4}$$

where λ is the wavelength in nm and A, B and Cauchy coefficients $A = 1.4753$, $B = 4.3902 \times 10^{-3}$ and $C = 0.92385 \times 10^{-8}$. The scattering coefficient (μ_s) was calculated from μ'_s and g , based on the similarity relation: $\mu_s = \frac{\mu'_s}{(1-g)}$.

Since the major components of the subcutaneous adipose tissue and their respective concentrations are well-known (Table 1), as well as their absorption coefficients, a theoretical μ_a spectrum can be calculated by summing the absorption spectra of pure lipid and water weighted with their respective concentrations, based on lipid and water absorption coefficients provided by the “Natural Phenomena Simulation Group” of the University of Waterloo (USA) (water: Palmer et al., 1974; Altshuler et al., 2003 and lipid: van Veen et al., 2004) and the average concentrations mentioned in Table 1 for each parameter, a theoretical μ_a spectrum for porcine adipose tissue was retrieved.

3. Results

The structure of the subcutaneous adipose tissue consisting of spherical cells (adipocytes) storing lipids which are uniformly distributed and joined by reticular fibrils, with nerves and blood capillaries in the intercellular spaces. This microstructure determines the propagation of NIR light through the tissue. Several authors have reported the chemical composition of pig adipose tissues, mainly consisting of hemoglobin (absorbs in the visible region), lipids and water (these last two components absorb in the NIR region). The average concentration of those two NIR-absorbing components, reported in different studies, are summarized in Table 1.

Table 1. Lipid and moisture concentration in pig adipose tissue.

Reference	Lipid (%)		Moisture (%)
Aberle et al. (1977)	9.76		87.75
Geri et al. (1990)	9.2	(heavy)	75.7
	13.0	(light)	73.2
	12.9	(male)	79.4
Lebret & Mourot (1998)	9.0	(male castrated)	82.3
	10.3	(female)	80.8
Average	10.23		81.19

In Figure 2, the acquired total reflectance and total transmittance spectra (M_R and M_T) in the DIS setup and the unscattered transmittance (M_{Tj}) spectra in the wavelength range 1150-2250 nm are presented for two different thicknesses of the adipose tissue layers. Differences in total reflectance and total transmittance were observed in function of the sample thickness. A thicker

sample corresponded, as expected, to larger M_R values (average values with a minimum of 5.17 % to a maximum of 30.01 % for 1100 μm thickness and from 5.81 % to 25.15 % for 550 μm) and lower M_T values (average values with a minimum of 6.03 % to a maximum of 56.70 % for 1100 μm thickness and from 15.78 % to 67.25 % for 550 μm). The main effect related to the sample thickness was observed on the unscattered transmittance (M_U) values with the average spectrum varying between 0.00075 % and 0.0022 % for an 1100 μm thick sample, while M_U for 550 μm thickness was much higher: 0.002 %–0.0147 %. For both sample thicknesses, the unscattered light detected was low, even for high power illumination by the supercontinuum laser, restricting the SNR of the calculated M_U . This could have an important effect on the estimation of the bulk optical properties with the IAD method, especially for the estimation of the anisotropy factor (Prahl, 2010).

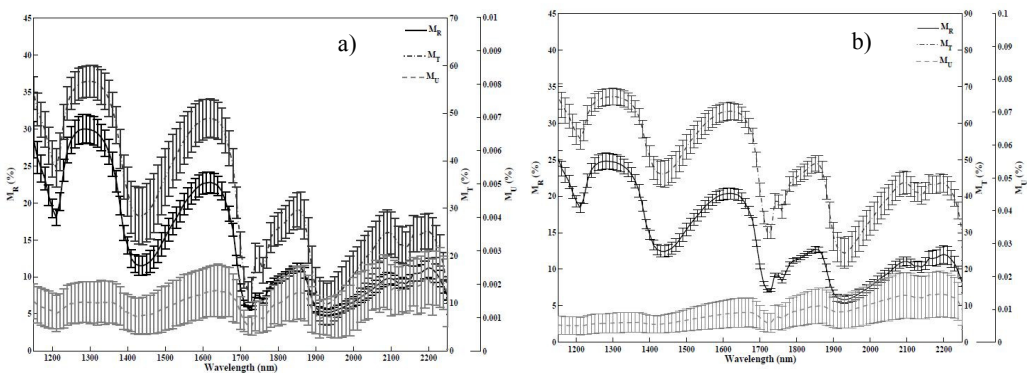


Figure 2. Measured total reflectance (M_R), total transmittance (M_T) and unscattered transmittance (M_U) values of porcine subcutaneous adipose tissues in a DIS and unscattered transmittance measuring system based on a supercontinuum laser. a) layer thickness 1.1 mm; b) layer thickness 550 μm . The solid lines correspond to the average values and vertical lines show the standard deviation values.

In all the DIS measurements, independent of the thickness, clear absorption bands related to water (1210, 1400–1480 and 1900–1980 nm) and lipids (1210, 1720–1760 and 2120–2140 nm) were observed (Williams & Norris, 1987; Osborne et al., 1993; Garrido et al., 2004). Standard deviation values indicated differences in water and lipid content between the different tissue samples, which could be explained by differences in feeding regimes and genetic backgrounds of the different pigs since they significantly influence the fat deposition and composition (Flores et al., 1988; Ruiz et al., 1998, Ventanas et al., 2001).

Figure 3 shows the average bulk of optical properties spectra (μ_a , μ_s (Figure 3a), g and μ'_s (Figure 3b)) estimated with the IAD method for the different sample thicknesses. Relatively small differences between the absorption

coefficients (μ_a) were observed in water-related bands, which can be due to some small rehydration differences during the sample preparation. The reduced scattering coefficients (μ'_s), which are mainly influenced by M_R and M_T , were quite similar for both thicknesses (Figure 3b). However, the major differences between the optical properties for the 550 μm and 1100 μm thick adipose tissue layers were observed in the anisotropy factors (g) and the scattering coefficients (μ_s). The estimated anisotropy values varied between 0.86 and 0.93 for 1100 μm thickness and between 0.91 and 0.95 for 550 μm thick samples (Figure 3b), while the scattering coefficients (μ_s) were in the range of 100.47–112.12 cm^{-1} (1100 μm thickness) and 154.92–185.70 cm^{-1} (550 μm thickness) (Figure 3a). All scattering coefficients were decreasing with the increasing wavelength, which can be explained by the decrease of the contribution of Mie scattering (Bashkatov et al., 2011). Although in both cases, the wavelength-dependent shape of g was the same, a noisier tendency was observed for the thicker samples, according to the lower signal levels of M_U (Figure 2). Moreover, thicker samples are related to more multiple scattering effects which could result in more forward scattered light collected as unscattered light. This would lead to an underestimation of the extinction coefficient ($\mu_t = \mu_a + \mu_s$). For more or less the same values of μ_a and μ'_s , like observed for the different thicknesses, this would result in an underestimation of both g and μ_s for the thick samples.

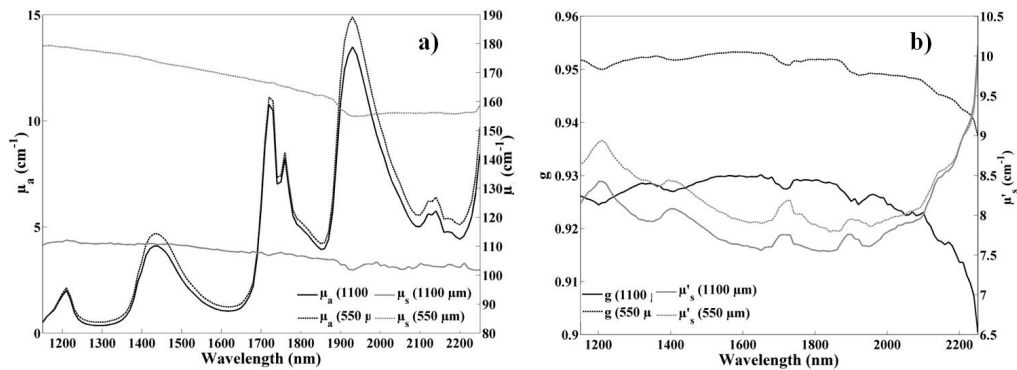


Figure 3. Bulk of optical properties for porcine subcutaneous adipose tissue estimated using the IAD method for the different layer thicknesses. a) absorption coefficient and scattering coefficient; b) anisotropy factor and reduced scattering coefficient. The lines correspond to the average values.

The most reliable bulk optical properties for pork subcutaneous adipose tissue were, therefore, obtained with 550 μm thick samples because of the higher SNR and more reliable unscattered transmittance measurements. Therefore, the results discussed further in this study focus on the 550 μm thick samples. In Figure 4, the average and the standard deviation (vertical lines) of

the bulk optical properties estimated with IAD method based on DIS and unscattered transmittance measurements are illustrated for the ten iberian pig subcutaneous adipose tissue samples (550 μm thickness). The absorption coefficient is dominated by water (with maximum absorption peaks at 1210, 1440 and 1930 nm) and lipids (with maximum absorption peaks at 1210, 1720, 1760 and 2140 nm) (Figure 4a). Larger standard deviations were observed at the water-related bands compared to the lipid-related absorption, probably due to the different nature of the samples and possible differences in the rehydration during sample preparation. Figure 4b presents the spectral dependence and natural variation of the scattering coefficient of porcine subcutaneous adipose tissue. Scattering is dominated by the spherical droplets of lipids (adipocytes) which are typical for adipose tissue structure. The standard deviation values represented as the vertical bars showed slight differences in the scattering coefficient between the 10 samples. This can be related with some variations in the individual metabolism of the animals or changes in the feeding regime (Flores et al., 1988; Ruiz et al., 1998, Ventanas et al., 2001) since the texture of the tissue may vary (composition, droplet size and aggregation pattern). In Figure 4c, the estimated anisotropy factor values are presented. It can be seen that these are quite stable around 0.95 for the full wavelength range studied. However, the spectral behaviour of g shows a decreasing tendency, influenced by the major absorption bands in some areas.

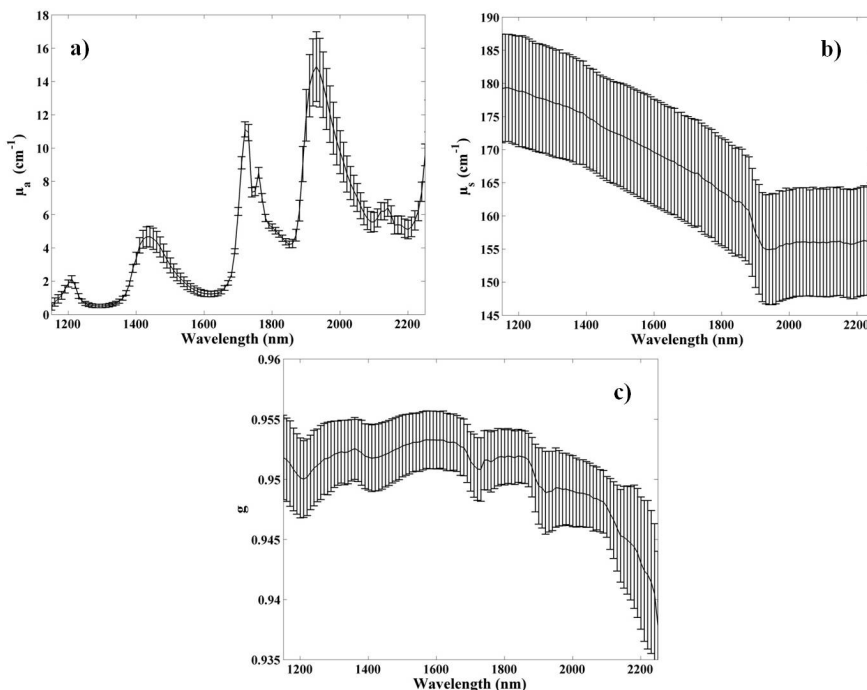


Figure 4. Bulk of optical properties for 550 μm thick subcutaneous adipose tissue layers estimated using IAD. a) absorption coefficient; b) scattering coefficient; c) anisotropy factor. The solid lines correspond to the average values and vertical lines show the standard deviation values

4. Discussion

In Figure 5, the optical properties obtained in this study are compared with the data reported by other researchers for human adipose tissue (Bashkatov et al., 2005a), rat subcutaneous adipose tissue (Bashkatov et al., 2005b) and human subcutaneous adipose tissue (Salomatina et al., 2006). Bashkatov et al. (2005a) measured 6 human adipose tissue samples on a single integrating sphere (IS) and estimated μ_a and μ'_s using the IAD method and assuming a fixed g value of 0.9. In Bashkatov et al. (2005b) 10 rat subcutaneous adipose tissue samples with a thickness between 1–2 mm were measured using the same approach. Moreover, 10 human subcutaneous adipose tissue samples were measured by Salomatina et al. (2006) on a single IS, estimating the optical properties by Inverse Monte Carlo simulations, assuming a fixed g and refractive index of respectively 0.8 and 1.4. The thickness of the samples varied between 280 and 800 μm . The data reported by these authors, and plotted in Figure 5, were extracted from their published figures by a mathematical approximation algorithm based on an interpolation function.

The results obtained in this study agreed better with the theoretical μ_a spectra than the data published in the above-mentioned articles (Figure 5a). Although the same absorption bands for water and lipids appear in all the μ_a data, the values at the absorption bands are all on a different level. The μ_a of human subcutaneous adipose tissue by Salomatina et al. (2006) showed a much higher water absorption at the 1440–1490 nm region and a similar absorption at 1210–1210 nm (combination of absorption by water and lipid) compared to the theoretical μ_a . This indicates that the absorption by the tissue was dominated by water rather than lipid, in contrast to the theoretical absorption by subcutaneous adipose tissues in pigs (Table 1, Figure 5a). This might be related to the rehydration process with saline of the sample performed by the authors for sample presentation. Moreover, the absorption coefficients reported in previous studies are relatively shifted compared to the theoretical μ_a . The absorption bands in μ_a for human and rat (subcutaneous) adipose tissues reported by Bashkatov et al. (2005a and 2005b) suggest that the absorption by both water and lipids in these tissues was lower than what would be expected based on the average concentrations. Moreover, at the wavelengths where almost no absorption is expected (1150, 1300 and 1630 nm), because of the low absorption coefficients of pure water and pure lipids, a clear baseline was present in μ_a for all the previous studies. This suggests that in these studies the absorption coefficient values were overestimated.

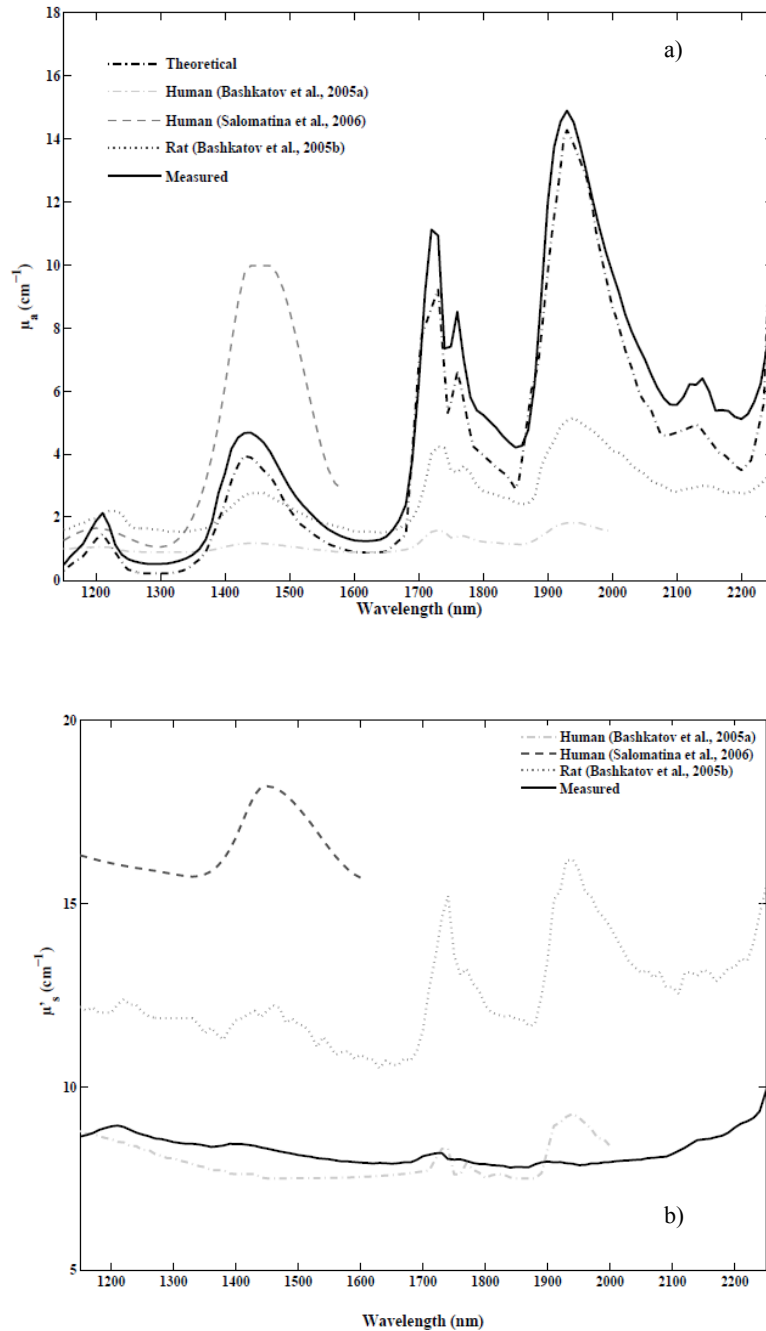


Figure 5. Comparison of *in vitro* human and animal subcutaneous adipose tissue optical properties. a) absorption coefficient; b) reduced scattering coefficient.

In Figure 5b, the reduced scattering coefficients of human and animal subcutaneous adipose tissues obtained by different researchers are plotted together. Big discrepancies can be observed between the results presented in

this work and the data reported by Bashkatov et al. (2005b) and Salomatina et al. (2006). While the μ'_s in this study, was estimated with an interval of 10 nm between wavelengths showing a smooth decreasing tendency with increasing wavelength until 2000 nm, data reported in previous studies showed clear absorption peaks for both water and lipids. The μ'_s spectra reported by Bashkatov et al. (2005a) are much more similar to the results obtained in this study. However, water and lipid absorption bands can also be observed in their μ'_s spectra. A small portion of these absorption effects in μ'_s might be explained by the fact that, in the range of strong absorption bands, the imaginary part of the complex refractive index of scattering centres (adipocytes) increases. This results in an increase in the reduced scattering coefficient and a decrease in the anisotropy factor (Bashkatov et al., 2005b). However, this effect is rather limited and cannot explain the big peaks observed in the μ'_s spectra reported by other researchers. A more logical explanation for these phenomena would be an insufficient separation of the effects of absorption and scattering, leading to the overestimation of μ'_s and underestimation of μ_a at water and lipid absorption bands. A better separation would result in an increase in the peaks in the μ_a spectra and bring these much closer to the theoretical μ_a values. Removing the absorption peaks from μ'_s would result in scattering coefficients close to the ones observed in this study. The poor separation between absorption and scattering in previous studies might have been caused by an ill-conditioning of the input parameters for the IAD algorithm. Since it is not easy to obtain the refractive index information for each wavelength considered, for each sample and for the glass slides, an error on the refractive index mismatch at boundaries is easily made. In the IAD procedure, the specular reflectance is calculated first and subtracted from the diffuse reflectance. Therefore, the refractive indices have a significant influence on the diffuse reflectance that is used as an input for the core IAD code, influencing the final estimations. As a result, accurate values of the refractive indices are indispensable for accurate estimations of the bulk optical properties. Since in previous studies a fixed guess for the refractive index of the adipose tissue was used (e.g. 1.4 in Salomatina et al. (2006)), it is likely that this has introduced significant errors in the estimation of the bulk optical properties. Another explanation for the better results obtained in this study, as compared to those previously reported, is the use of a DIS system in combination with a high power supercontinuum laser instead of a single sphere in combination with a halogen light source. A DIS system allows for simultaneous and robust measurements of M_T and M_R without replacing the sample or the sphere. The use of a supercontinuum laser light source makes it possible to focus a high power beam on a very small spot on the sample, reducing the lateral light losses in the sample and cuvette. Other possible explanations for the variation between the bulk optical properties obtained by different researcher are the underlying assumption of the light propagation, the experimental equipment used, the instrument calibration and the heterogeneity of the samples (Tuchin, 2007).

Since DIS measurements were combined with unscattered transmittance, all three bulk optical properties could be estimated. This resulted for the first time in a wavelength-dependent estimate of the anisotropy factor for subcutaneous adipose tissue over the wavelength range 1150 – 2250 nm. From Figure 4a and 4c, it can be concluded that the major fat (1210, 1720, 1760 and 2140 nm) and water (1210, 1440 and 1930 nm) absorption bands are represented as small reductions in the anisotropy factor, an observation which was also reported by Bashkatov et al. (2005a). Moreover, as the anisotropy factor is relatively high (± 0.95), which makes that a small change in g will have a relatively large impact on μ_s (i.e. $\mu'_s/(1 - g)$). The presence of absorption information in μ'_s was already shown by Bashkatov et al. (2005a) and confirmed in this study. However, because no unscattered transmittance was measured in previous studies, it was not possible to estimate a correct μ_s . In this study, μ_s was estimated very accurately, following a smooth decrease with increasing wavelength (Figure 4b). In contradiction to the discussion by Bashkatov et al. (2005a), almost no absorption information was present in μ_s , except for the very strong water absorption band at 1930 nm. This phenomenon is probably caused by the low transmittance and reflectance of the samples in that wavelength region and consequently a low SNR, rather than the effect of absorption on μ_s .

5. Conclusions

The bulk optical properties of porcine subcutaneous adipose tissue were measured in the NIR wavelength range 1150–2250 nm by combining double integrating spheres measurements with unscattered transmittance measurements. Water and lipid related bands were found to dominate the absorption coefficient spectra, while the scattering coefficient spectra showed a steady decrease with increasing wavelength. Moreover, the anisotropy factor was obtained for the full wavelength range, showing a relatively high value (± 0.95), decreasing with increasing wavelength and with some signature from the absorption bands of water and lipids. Estimated and theoretical absorption coefficient spectra agreed fairly well, indicating the reliability of the measurements.

The optical characterization of the subcutaneous adipose tissue layer gives insight into the absorption, scattering and angular scattering distribution of NIR light propagating through the tissue. This is essential to understand the individual effects of absorption and scattering in NIR spectroscopy. Moreover, the data reported here may be useful for improving NIR sensors designs and modelling procedures in order to optimize the spectra quality and/or obtain relevance information from non-destructive adipose tissue measurements.

Acknowledgements

This study was carried out at the University of Leuven (KU Leuven) while Eduardo Zamora-Rojas was a visiting PhD student. He acknowledges the

financial support of the Spanish Ministry of Education as a fellow of the Program “Training of University Teachers” (Formación del Profesorado Universitario, FPU). Ben Aernouts and Wouter Saeys are respectively funded as aspirant and postdoctoral fellow of the Research Foundation–Flanders (Brussels, Belgium). This work was financed by the research projects: and n° P09-AGR-5129 (Research Excellence Program of the Andalusian Regional Government). The authors are grateful to the Spanish Protected Designation of Origin Los Pedroches and to the Spanish iberian pork industry COVAP S.C.A. for providing experimental materials. Thanks are given to the Department of Biology, Animal Physiology and Neurobiology Section (KU Leuven) for their advice and assistance in preparing the samples.

References

- Aberle ED, Ethertun TD & Allen CE (1977) Prediction of pork carcass composition using subcutaneous adipose tissue moisture or lipid concentration. *Journal of Animal Science*, 46(3), 449-456.
- Altshuler, Anderson & Manstein (2003) Method and apparatus for the selective targeting of lipid-rich tissue. United States Patent No 6605080 B1.
- Arimoto H, Egawa M & Yamada Y (2005) Depth profile of diffuse reflectance near-infrared spectroscopy for measurement of water content in skin. *Skin Research and Technology*, 11, 27-35.
- Bashkatov AN, Genina EA & Tuchin VV (2011) Optical properties of skin, subcutaneous and muscle tissues: a review. *Journal of Innovative Optical Health Sciences*, 4(1), 9-38.
- Bashkatov AN, Genina EA, Kochubey VI & Tuchin VV (2005a) Optical properties of human skin, subcutaneous and mucous tissues in the wavelength range from 400 to 2000 nm. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 38, 2543-2555.
- Bashkatov AN, Genina EA, Kochubey VI & Tuchin VV (2005b) Optical properties of the subcutaneous adipose tissue in the spectral range 400-2500 nm. *Optics and Spectroscopy*, 99(5), 836-842.
- Cheng S, Shen HY, Zhang G, Huand CH & Huang XJ (2002) Measurement of the refractive index of biotissue at four laser wavelengths. *Proceedings of SPIE*, 4916, 172-176.
- De Pedro E, Garrido A, Bares I, Casillas M & Murray I (1992) Application of near infrared spectroscopy for quality control of iberian pork industry. In: Hildrum, Isaksson, Naes & Tandberg (eds.) *Near infrared spectroscopy bridging the gap between data analysis and NIR applications*, pp 345-348. Ellis Horwood, UK.
- De Pedro E, Garrido A, Lobo A, Dardenne P & Murray I (1995) Objective classification of iberian pig carcasses: GC versus NIR. In: Batten, Flinn, Welsh & Blakeney (eds.) *Leaping ahead with near infrared spectroscopy*, pp. 291-295. NIR Spectroscopy Group. Royal Australian Chemistry Institute, Melbourne, Australia.
- Fernández-Cabanás VM, Garrido-Varo A, García-Olmo J, De Pedro-Sanz E & Dardenne P (2007) Optimisation of the spectral pre-treatments used for iberian pig fat NIR calibrations. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 87, 104-112.
- Flores J, Birón C, Izquierdo L & Nieto P (1988) Characterization of green hams from iberian pigs by fast analysis of subcutaneous fat. *Meat Science*, 23, 253-262.

García-Olmo J, Garrido-Varo A & De Pedro E (2001) The transfer of fatty acid calibration equations using one set of unsealed liquid standardisation samples. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 9, 49-62.

García-Olmo J, Garrido-Varo A, & De Pedro E (2009) Classification of real farm conditions iberian pigs according to regime with multivariate models developed by using fatty acids composition or NIR spectral data. *Grasas y Aceites*, 60(3), 233-237.

Garrido A, García-Olmo J & Pérez-Marín D (2004) Analysis of fats and oils. In: Roberts, Workman & Reeves (eds.) *Near-infrared spectroscopy in agriculture*, pp. 487-558. Agronomy, Crop Science and Soil Science Societies of America, Madison, WI, USA.

Gerl G, Pol BM, Zappa A, Campodoni G & Franci O (1990) Relations between adipose tissue characterization of newborn pigs and subsequent performance III: Histological and chemical characteristics of backfat. *Journal of Animal Science*, 68, 1936-1943.

Hervás C, Garrido A, Lucena B, García N, & De Pedro E (1994) Near infrared spectroscopy of iberian pig carcasses using an artificial neural network. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 2, 177-184.

Inio K, Maruo K, Airomo H, Hyodo K, Nakatani T & Yamada Y (2003) Monte Carlo simulation of Near Infrared Reflectance Spectroscopy in the wavelength range from 1000 nm to 1900 nm. *Optical Review*, 10(6), 600-606.

Lebret B & Mourot J (1998) Caractéristique et qualité des tissue adipeux chez le porc. Facteurs de variation non génétiques. *INRA Productions Animales*, 11(2), 131-143.

Martelli F (2012) An ABC of near infrared photon migration in tissues: the diffuse regime of propagation. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 20, 29-42.

Osborne BG, Fearn T & Davies T (2002) Practical NIR spectroscopy with applications in food and beverage analysis. In: Osborne, Fearn & Hindle (eds.) *Food and beverage analysis*, pp. 11-35. Essex:Longmand.

Palmer KF & Williams D (1974) Optical Properties of water in the near infrared. *Journal of the Optical Society of America*, 64, 1107-1110.

Pérez-Juan M, Afseth NK, González J, Díaz I, Gispert M, Font i Furnols M, Oliver MA & Realini CE (2010) Prediction of fatty acid composition using a NIRS fibre optics probe at two different locations of ham subcutaneous fat. *Food Research International*, 43(5), 1416-1422.

Pérez-Marín D, De Pedro E, Guerrero-Ginel JE & Garrido-Varo A (2009) A feasibility study on the use of near-infrared spectroscopy for prediction of the fatty acid profile in live iberian pigs and carcasses. *Meat Science*, 83, 627-633.

Pérez-Marín D, Fearn T, Guerrero-Ginel JE & Garrido-Varo A (2010) Robustness in pig fat NIRS calibrations by orthogonal projection. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 100(1), 36-40.

Pérez-Marín D, Garrido-Varo A, De Pedro E & Guerrero-Ginel JE (2007) Chemometric utilities to achieve robustness in liquid NIRS calibrations: application to pig fat analysis. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 87, 241-246.

Pickering JW, Prahl SA, van Wieringen N, Beek JF, Henricus JC, Sterenborg M & van Gemer MJC (1993) Double integrating-sphere system for measuring the optical properties of tissue *Applied Optics*, 32(4), 399-410.

Prahl SA (2010) Everything I think you should know about Inverse Adding Doubling. Available at: <http://omlc.ogi.edu/software/iad>. Accessed 6 November 2012.

Prevolnik M, Candek-Potokar M & Skorjanc D (2004) Ability of NIR spectroscopy to predict meat chemical composition and quality-a review. *Czech Journal of Animal Science*, 49(11), 500-510.

Prieto N, Roehe R, Lavín P, Batten G & Andrés S (2009) Application of near infrared reflectance spectroscopy to predict meat and meat products quality: a review. *Meat Science*, 83, 175-186.

Renaudeau D, Leclercq-Smekens M, & Herin M (2006) Differences in skin characteristics in European (Large white) and Caribbean (Creole) growing pigs with reference to thermoregulation. *Animal Research*, 55, 299-217.

Ruiz J, Cava R, Antequera T, Martín L, Ventanas J & López-Bote C (1998) Prediction of the feeding background of iberian pig using the fatty acid profile of subcutaneous, muscle and hepatic fat. *Meat Science*, 49(2), 155-163.

Saeyns W, Velazco-Roa M, Thennadil S, Ramon H & Nicolaï B (2008) Optical properties of apple skin and flesh in the wavelength range from 350 to 2200 nm. *Applied Optics*, 47(7), 908-919.

Salomatina E, Jiang B, Novak J & Yaroslavsky AN (2006) Optical properties of normal and cancerous human skin in the visible and near-infrared spectral range. *Journal of Biomedical Optics*, 11(6), 0640261-0640269.

Tuchin VV (2007) Methods and algorithms for the measurement of optical parameters of tissues. In: Tuchin (ed.) *Tissue optics: light scattering methods and instruments for medical diagnosis* (2nd edition), pp. 143-256. SPIE. Washington, USA.

Van Veen RLP, Sterenborg HJCM, Pifferi A, Torricelli A & Cubeddu R (2004) Determination of VIS-NIR absorption coefficients of mammalian fat, with time and spatially resolved diffuse reflectance and transmission spectroscopy. OSA Annual BIOMED Topical Meeting.

Ventanas J, Gázquez A, Muriel E, Petró MJ, Carraspiso AI & Tejeda JF (2001) La grasa intramuscular y la calidad del jamón. In: Proceedings of the 1st World Congress of Ham Science, Technology and Market, pp. 45-51. Córdoba, Spain.

Wang L, Sharma S, Aernouts B, Ramon H, Saeys W (2012) Supercontinuum laser based double-integrating-sphere system for measuring optical properties of highly dense turbid media in the 1300-2350nm region with high sensitivity. In: Popp, Drexler, Tuchin & Matthews (eds.) Proceedings of the Society of Photo-Optical Instrumentation Engineers, 8427, pp. 1-8. SPIE Photonics Europe.

Weeranantanaphan J, Downey G, Allen P & Sun DW (2011) A review of near infrared spectroscopy in muscle food analysis: 2005–2010. Journal of Near Infrared Spectroscopy, 19, 61–104.

Williams PC & Norris KH (1987) Near-infrared technology in the agricultural and food industries. American Association of Cereal Chemists, St. Paul, MN, USA:.

Zamora-Rojas E, Pérez-Marín D, De Pedro-Sanz E, Guerrero-Ginel JE & Garrido-Varo A (2012) *In-situ* iberian pig carcass classification using a micro-electro-mechanical systems (MEMS)-based near infrared spectroscopy. Meat Science, 90, 636-642.

5.5.2. Optical properties of pig skin epidermis and dermis estimated with double integrating spheres measurements

Eduardo Zamora-Rojas^{1*}, Ben Aernouts², Ana Garrido-Varo¹, Wouter Saeys², Dolores Pérez-Marín¹ and José Emilio Guerrero-Ginel¹

¹ Department of Animal Production, Non-Destructive Spectral Sensor Unit, Faculty of Agricultural and Forestry Engineering, University of Córdoba, Agrifood Campus of International Excellence (ceiA3), Campus Rabanales, N-IV, km 396, Córdoba, 14014, Spain.

² Department of Biosystems, Division of Mechatronics, Biostatistics and Sensors, University of Leuven, Kasteelpark Arenberg 30, Leuven, 3001, Belgium.

* Corresponding author: e.zamora@uco.es

Abstract

Non-invasive and non-destructive Near Infrared Reflectance Spectroscopy (NIRS) analysis of pork quality parameters is challenging due to the presence of a structured skin layer. The optical characterization (absorption coefficient, scattering coefficient and anisotropy factor) of porcine skin tissue can help in a better understanding of the light-tissue interaction, more efficient instrumental sensor designs and data modelling. For this purpose, a double integrating spheres combined with an unscattered transmittance measurement system working in the range 1150-2250 nm (interval step of 10 nm) was used for optical characterization of pig epidermis and dermis. The estimated pig skin absorption coefficient spectra were dominated by water, while scattering coefficient spectra showed a steady decrease tendency with increasing wavelength, except at strong absorption bands. The anisotropy factor spectra showed a stable value for each layer, although also some signatures were observed at strong absorption bands.

Keywords: Optical properties; Double integrating spheres, Scattering, Absorption, Inverse adding-doubling; Near-infrared; Epidermis; Dermis; Pig.

1. Introduction

The interest in the development of optical sensors based on Near Infrared Reflectance Spectroscopy (NIRS) to perform non-destructive and non-invasive analysis that provide information on both physical and chemical characteristics of biological materials has increased significantly. Short NIR wavelengths can penetrate deeply into the skin, offering a potential spectral window for this kind of analysis without the hazards of ionizing radiation. In the case of the pork industry, NIRS has enabled very easy and fast quantitative and qualitative applications for predicting several quality parameters or carcasses/products grading (Prevolnik et al., 2004; Prieto et al., 2009; Weeranantanaphan et al., 2011). However, it has been noticed that *in vivo* or on the skin NIRS measurements at the farm or slaughterhouse had a loss in performance. Quantitative NIRS applications for the prediction of the fatty acid profile exemplifies, clearly, this issue since melted fat analysis provided the best accuracy and precision models compared to the analysis of intact subcutaneous adipose tissue, intact carcasses or living animals (Pérez-Marín et al., 2007, 2009, 2010; Zamora-Rojas et al., 2013a).

The reason for a reduced predictive performance when NIRS measurements are collected on living pigs or intact pig carcasses is that the captured light (e.g. reflectance) is highly scattered by the complex structure of the skin, consisted of three major layers: epidermis (blood free layer), dermis (vascularised layer with dense irregular connective tissue with collagenous fibers) and hypodermis (subcutaneous adipose tissue layer composed of two sub-layers separated by thin connective tissue) (Renaudeau et al., 2006). The light has to travel through all these layers before reaching the layer of interest, the subcutaneous adipose tissue, influencing in the collected reflectance signal. Understanding the light-tissue interactions and light propagation through these tissue types is essential for the correct interpretation of a measured signal. In order to model these interactions, knowledge of the bulk optical properties for the different tissue layers is necessary. Moreover, this information is crucial for NIRS sensor developers towards the maximization of the NIR penetration depth to reach the layer of interest with the proper wavelengths (Inio et al., 2003; Arimoto et al., 2005).

Information about the optical properties of pig skin (epidermis and dermis) is limited to the short NIR wavelength range (< 1600 nm) and was recently reviewed by Bashkatov et al. (2011). Du et al. (2001) reported the pork dermis optical properties in the 900-1500 nm range, while Cain et al. (2004) studied epidermis and dermis between 1000 and 1600 nm. Ma et al. (2005) reported the bulk of optical properties of pork skin dermis at four single NIR wavelengths (850, 1064, 1310 and 1557 nm). However, quality control of pork products with NIRS mostly considers longer NIR wavelengths, related to the major fat absorption bands (1720-1760, 2150 and 2310-2340 nm). In a

previous study, the authors of this paper already reported the bulk of optical properties for pork subcutaneous adipose tissue (Zamora-Rojas et al., 2013b).

Double integrating spheres (DIS) equipments can measure simultaneously total reflectance and total transmittance, what provides more robust and accurate measurements than single integrating spheres (Pickering et al., 1993; Prahl, 2010, Bashkatov et al., 2011). Simulation procedures are required for estimation of the optical properties from these measurements in order to solve the Radiative Transfer Equation (RTE) that describes the photon propagation in scattering and absorbing media (Martelli, 2012; Tuchin 2007; Bashkatov et al., 2011). Inverse Adding Doubling (IAD) algorithm is one of the existing methods which can be used to extract the bulk optical properties (μ_a and μ'_s) from DIS measurements since iteratively changes their values until the simulated reflectance and transmittance values math the measured ones (Prahl, 2010).

Thus, the present study aimed to obtain the bulk optical properties of pork epidermis and dermis in the wavelength range from 1150-2250 nm, covering the absorption peaks of interest, from DIS measurements combined with unscattered (collimated) transmittance measurements to extract all three optical properties (μ_a , μ_s and g) through the IAD routine.

2. Materials and methods

2.1. Sample set

Skin iberian pig tissue samples, obtained post-mortem near the tail insertion area at a Spanish slaughterhouse, were used for *in vitro* DIS measurements. The samples were frozen by liquid nitrogen and kept at -20°C until 24 hours before the analysis. A total number of 7 epidermis and 8 dermis samples were used. Epidermis was sliced in thin cuts of $550\ \mu\text{m}$ thickness, while dermis samples were cut to $1100\ \mu\text{m}$ thickness, using a cryotome (Microm HM 560, Prosan) at -10°C . In both cases, the sample size was of 30 mm diameter. Biological water (0.9 % NaCl) was added to reduce refractive index mismatch between glass and sample in the cuvette.

2.2. Double integrating spheres and unscattered transmittance measurements

A DIS and unscattered transmittance measuring system, composed of a novel wavelength tuneable spectroscopic setup based on a supercontinuum laser, was used for acquiring total reflectance (M_R), total transmittance (M_T) and unscattered/collimated transmittance (M_U) in the wavelength range 1150-2250 nm, with an interval step of 10 nm. Detailed information about the system used can be found in Wang et al., 2012 and Zamora-Rojas et al. (2013b).

The tissue layers were sandwiched between two optical borosilicate glass slides (1.1 mm wall thickness) separated by a spacer of $550\ \mu\text{m}$ or $1100\ \mu\text{m}$

(pathlength), depending on the sample thickness. A neutral density filter (NDF, Qioptiq, Luxembourg) of 3.0 optical density was used as a reference in the unscattered transmittance setup to prevent detector saturation during system calibration.

The methodology described by Prahl (2010) was followed for instrumental calibration and sample analysis. Automatic control of the system (laser, monochromator and detectors) was obtained through a purpose-designed program in LabView 8.5 (National Instruments, Austin, TX).

2.3. Optical properties estimation

A MATLAB (ver 7.10, The Mathworks Inc., Massachusetts, USA) code was designed to calculate M_R , M_T and M_U from the DIS and unscattered transmittance measurements. From these measurements, the absorption coefficient (μ_a), reduced scattering coefficient (μ'_s) and anisotropy factor (g) were estimated using the IAD program provided by Prof. Scott Prahl at the Oregon Laser Research Center (Prahl, 2010). Nevertheless, to solve the inverse problem, the knowledge of the refractive index of the sample is required in order to correct for internal reflection at the boundaries. Ding et al. (2005) reported refractive indices of porcine skin (epidermis and dermis) using a reflectometry system for eight wavelengths in the visible and near infrared region. Concretely, an approximate average refractive index of 1.41 for epidermis and 1.36 for dermis was proposed for the 1150-2250 nm wavelength range. The scattering coefficient (μ_s) was calculated from μ'_s and g , based on the formula $\mu_s = \frac{\mu'_s}{(1-g)}$.

3. Results and discussion

Skin presents a complex heterogeneous matrix with three visible separated layers: epidermis, dermis and subcutaneous adipose tissue. Epidermis is a blood-free layer, while dermis is a vascularised layer. The distribution of chromophores and pigments in both layers is inhomogeneous. Moreover, a randomly distribution of blood and hairy follicles exists in the dermis. Skin is a heterogeneous tissue with cells structures, chromophores or blood vessels either horizontally or vertically organized depending on the part of the body. Therefore, since all our samples are from the same area (10 cm from the tail insertion), we cannot extrapolate our results for the all body.

3.1. Pig epidermis optical properties

Pig epidermis, with an average thickness of 55 μm (Renaudeau et al., 2006), can be considered as a non-living tissue consisting of highly keratinized dead squamous cells. Physiologically however, it can be approached as a living tissue (total thickness 150 - 200 μm) which contains most of the skin pigmentation (melanin) (Bashkatov et al., 2011). Since it was hard to isolate a uniform thick and undamaged epidermis layer, samples were cut with a

thickness of 550 μm . Therefore, it is highly likely that epidermis was measured together with dermis.

Figure 1 shows the *in vitro* DIS measurements (M_R and M_T) and unscattered transmittance (M_U) for pork epidermis samples in the wavelength range 1150-2250 nm. As it can be observed from the figure, M_T measurements were almost zero at the wavelength range 1880-2040 nm due to the high water absorption. Therefore, the system was expected to fail in the optical property estimation at these wavelengths because of near-zero signal levels. Unscattered transmittance (M_U) values varied between 0 % and 0.07 % for a 550 μm sample thickness. This means that the unscattered light detected was low, even for high power illumination by the supercontinuum laser, restricting the SNR of the calculated M_U . This can have an important effect on the estimation of the bulk optical properties through the IAD method, especially the anisotropy factor (Prahl, 2010).

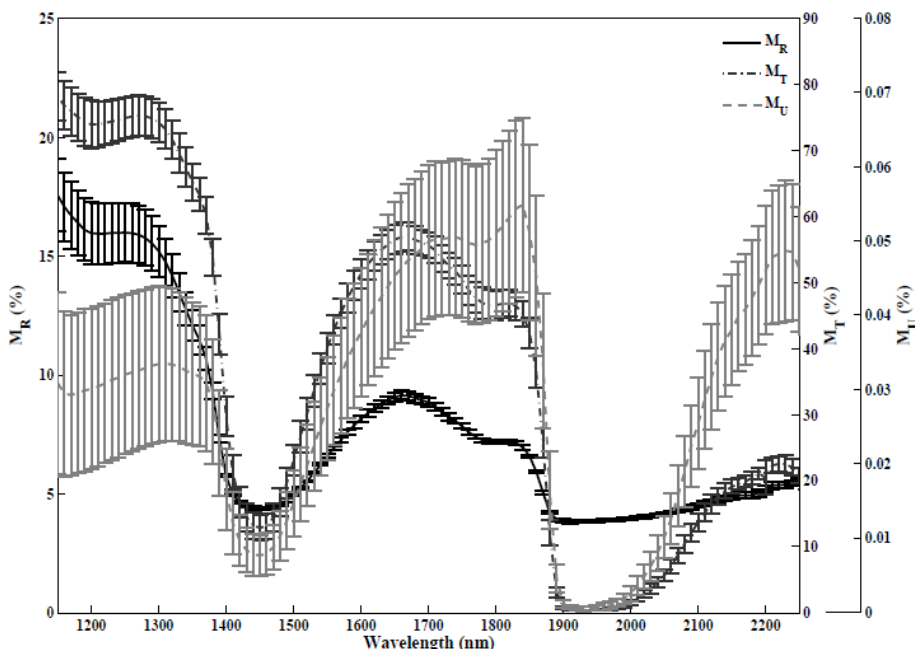


Figure 1. Measured total reflectance (M_R), total transmittance (M_T) and unscattered transmittance (M_U) values of porcine skin epidermis in a DIS and unscattered transmittance measuring system based on a supercontinuum laser. The solid lines correspond to the average values and vertical lines show the standard deviation values

In Figure 2, the average and the standard deviation (vertical bars) of the bulk optical properties (μ_a , μ_s and g) estimated with the IAD method are illustrated. The values obtained at the wavelength range 1880-2120 nm were not reliable due to near zero-values of the DIS measurements. Absorption coefficient spectra showed a clear absorption peak at the water-related band (1400-1480

nm) and a small peak around 1800 nm probably due to water and protein (collagen) (Williams & Norris, 1987; Osborne et al., 1993). Standard deviation values indicated the variations between the 7 samples measured that may be related to the heterogeneity of the layer and/or between individual animals. The estimated epidermis anisotropy factor spectra varied between 0.94 and 0.98, with a stable spectral behaviour decreasing at large wavelengths, although it was influenced by the strong water absorption at 1400-1480 nm (Figure 2). The scattering coefficient spectra of porcine epidermis tissue was decreasing with the increasing wavelength, which is typical for biological tissues and it can be explained by the decrease of the contribution of Rayleigh scattering (Bashkatov et al., 2011). The Rayleigh scattering approximation describes the wavelength dependence of the scattering coefficient for very small particles. Scattering in this layer is dominated by melanin grains and due to their small particle size (melanin cells with a diameter \ll wavelength), Rayleigh scattering contribution in the NIR region is significant, but decreasing with increasing wavelength. However, since some dermis may be present, some scattering effects could come from the collagen bundles (diameter \ll wavelength) in this layer (Bashkatov et al., 2006). A small increment in μ_s at 1400-1480 nm related to the large water absorption can be noticed. This absorption effect in μ_s may be explained by the fact that, in the range of strong absorption bands, the imaginary part of the complex refractive index of the tissue increases and, therefore, reflects as an increment in the scattering coefficient and a decrease in the anisotropy factor (Bashkatov et al., 2005b).

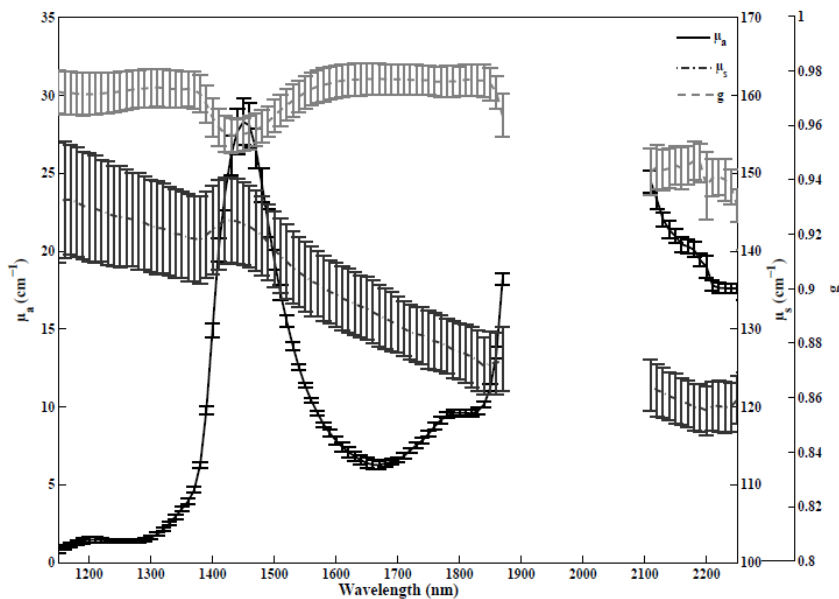


Figure 2. Bulk of optical properties for porcine skin epidermis estimated using the IAD method. The solid lines correspond to the average values and vertical lines show the standard deviation values

A comparison of the epidermis optical properties obtained in this study with other data reported for this tissue is shown in Figure 3. Cain et al. (2004) studied the porcine skin thermal response using a NIR laser and reported the optical properties of pork epidermis; however, they didn't provide any information on the used materials and optical Monte Carlo model. In Figure 3a, the absorption coefficient spectra of their work and the results obtained in this study are showed for the NIRS region studied. Although the same absorption bands for water appear in all the μ_a data, the values at the absorption bands are on a different level. The irregularities of the samples and their complex preparation may influence in the water content in the cuvette. In Figure 3b, the μ_s spectra data is illustrated, which both studies describe a smooth decreasing tendency with increasing wavelength (except for the strong water absorption band at 1400-1480 nm). However, the μ_s reported by Cain et al. (2004) was on a much lower level (95 cm^{-1} at 1200 nm) compared to the results in this study (145 cm^{-1}). Nevertheless, their μ_s results for epidermis and dermis were the same, what is not logical since epidermis and dermis have different composition and cell configuration.

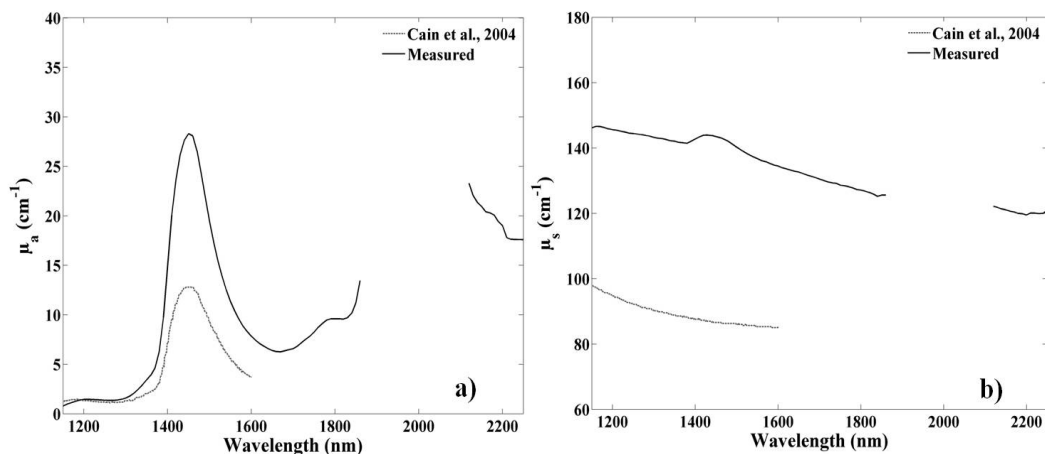


Figure 3. Comparison of *in vitro* porcine skin epidermis optical properties. a) absorption coefficient; b) scattering coefficient.

One of the difficulties found in this study was to obtain a clean pig epidermis sample with an adequate thickness that would enable a better characterization of this layer. Further work should be done regarding epidermis sample preparation to obtain a sample thickness lower than 500 μm , although reflectance signals can be very low. It should be noticed that variations in the results may also be related to: sample variations, pig to pig variations, assumption in the models, fixed refractive index, experimental equipments and instrument calibration.

3.2. Pig dermis optical properties

Pig dermis has an average thickness of 3.82 mm (Renaudeau et al., 2006) and the main absorbers are blood hemoglobin, β -carotene, bilirubin (these components absorb in the visible region) and water (absorbs in the near infrared range).

Figure 4 presents the *in vitro* DIS measurements (M_R and M_T) and unscattered transmittance (M_U) for pork dermis samples in the wavelength range 1150-2250 nm. As it was already observed for epidermis, also dermis M_T measurements showed near-zero signal levels in the 1880-2100 nm wavelength range and were therefore excluded for the optical property estimations. Unscattered transmittance (M_U) values varied between 0.0005 % and 0.004 % for a 1100 μm thick sample. Moreover, M_U values showed a noisy tendency at the wavelength range 1880-2100 nm due to the high water absorption.

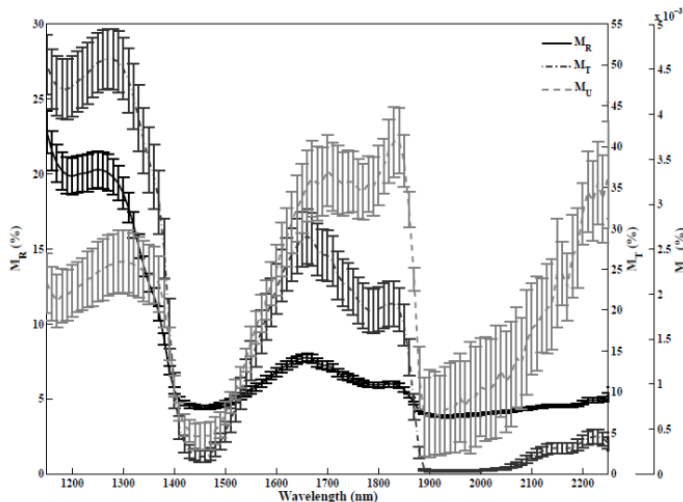


Figure 4. Measured total reflectance (M_R), total transmittance (M_T) and unscattered transmittance (M_U) values of porcine skin dermis in a DIS and unscattered transmittance measuring system based on a supercontinuum laser. The solid lines correspond to the average values and vertical lines show the standard deviation values

The bulk optical properties for 8 pork dermis samples, estimated by IAD method for DIS measurements, are shown in Figure 5. The values obtained at the wavelength range 1880-2120 nm are not presented as discussed earlier. As in the case of pig epidermis, the absorption coefficient spectra showed a strong peak at 1400-1480 nm due to water and a small peak around 1800 nm, probably due to water and collagen in the layer. The anisotropy factor spectrum is rather stable between 0.9 and 0.95 for the full wavelength range considered, however, at strong absorption bands a decrease in the values was

observed. Scattering coefficient showed a typical decreasing tendency with increasing wavelength as already observed for other biological tissues. In the case of dermis, scattering is dominated by the fibrous structure of the tissue consisted of collagen fibrils and bundles which have a diameter smaller than the wavelength. Studies done on human skin has shown that dermis scattering properties are mainly defined by the fibrous structure of the tissue (collagen fibrils packed forming a lamellae structure). The size of these packed fibers is different depending on the dermis region, being predominant backscattering in the papillary dermis and forward-directed scattering in the reticular dermis (Bashkatov et al., 2011). Since pig skin is often used as a model for human skin, although iberian pigs can have some specific features and characteristics, it can be assumed a quite similar skin structure and composition and, therefore, optical behavior. Nevertheless, at the strong water absorption band 1400-1480 nm, a lower μ_s was noticed.

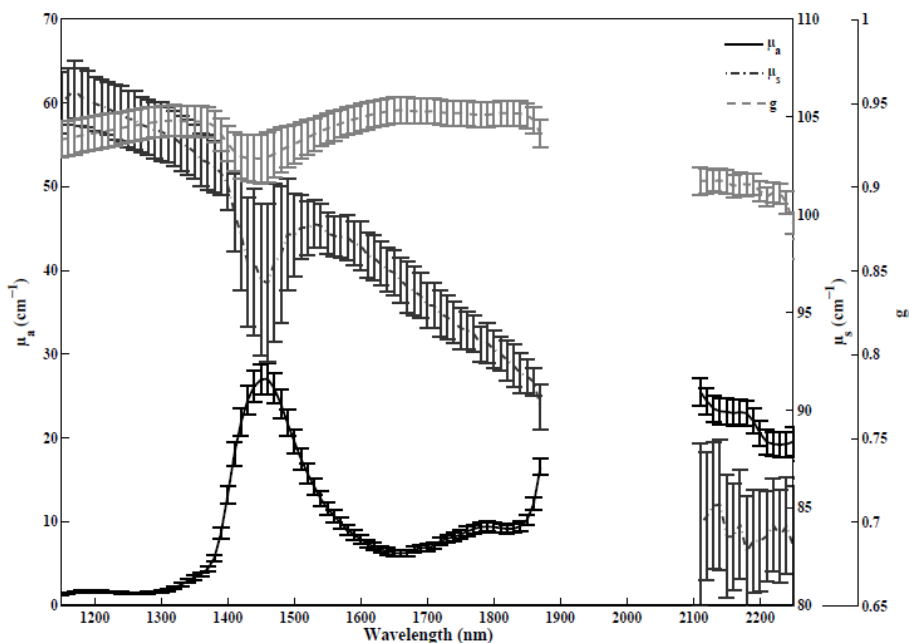


Figure 5. Bulk of optical properties for porcine skin dermis estimated using the IAD method. The solid lines correspond to the average values and vertical lines show the standard deviation values

In general, the variability showed by the standard deviation values for the different optical parameters may also be related to the variation of the dermis characteristics with regards to the depth in the dermis layer since the measured slices were not taken at a certain standard depth.

Figure 7 shows a comparison of pork dermis optical properties published by other authors and those reported in this study. Du et al. (2001) analyzed 44 pig

dermis samples on a single integrating sphere measured 20-30 hours post-mortem reporting μ_a , μ_s and g . Absorption coefficient shows a similar shape as our results, although their values were two times lower and agreed well with those reported by Cain et al. (2004) (Figure 6a). The measured μ_s (Figure 6b) was very close to the one reported by Cain et al. (2004) and followed the same decreasing tendency in function of an increasing wavelength. Du et al. (2001) reported a much higher μ_s spectra that also contained some signature from water and fat absorption due to maybe the no good separation between μ_a and μ'_s . The anisotropy factor spectra showed by Du et al. (2001) (Figure 6c) was rather stable for all the wavelengths, except at the strong water absorption bands. This was also observed in the anisotropy factor obtained in this study, however, Du et al. (2001) reported a larger decrease in g values at these wavelengths. Ma et al. (2005) reported pork dermis optical characteristics at four single NIR wavelengths (850, 1064, 1310 and 1557 nm) estimated with Inverse Monte Carlo (IMC) method with values of μ_a between 2 and 10.5 cm^{-1} , μ_s spectra quite stable around 250 cm^{-1} and g around 0.94, what differs from our results, except for the anisotropy value being lower the absorption coefficient in the range of the other authors and higher the scattering coefficient. It should be noticed that variations in the results may be also related to: sample variations, pig to pig variations, assumption in the models, fixed refractive index, experimental equipments and instrument calibration.

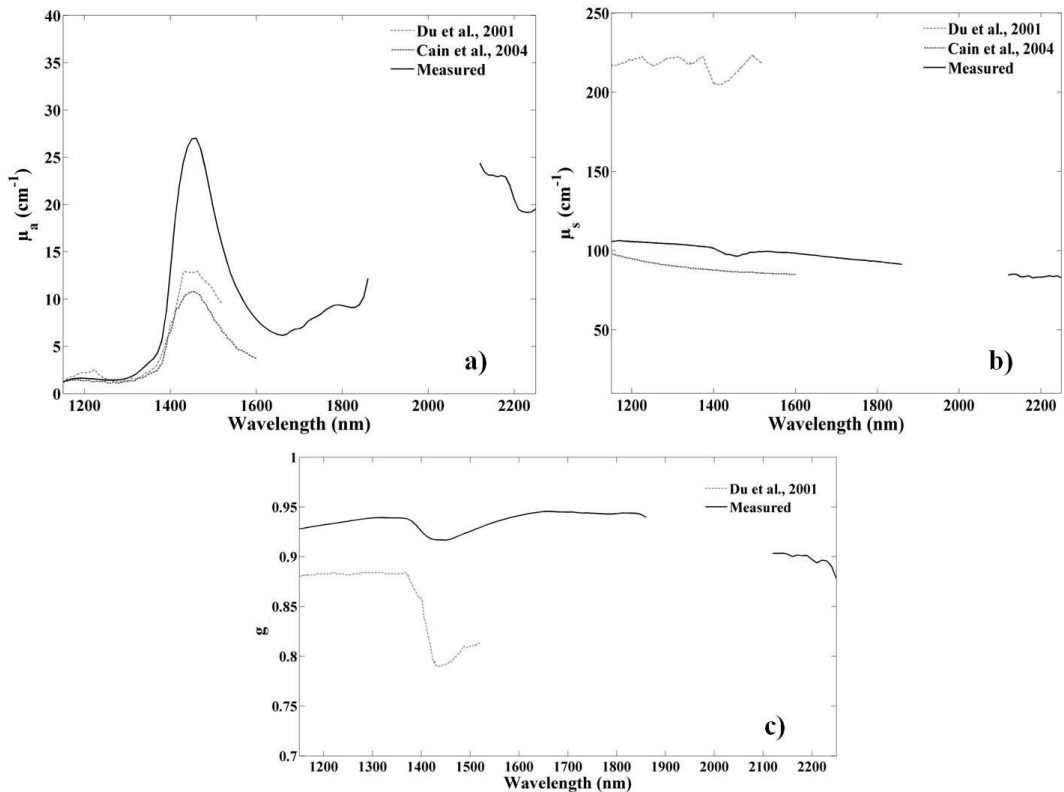


Figure 7. Comparison of *in vitro* porcine skin dermis optical properties. a) absorption coefficient; b) scattering coefficient; c) anisotropy factor.

4. Conclusions

In vitro porcine skin tissue has been optically characterized in the NIRS wavelength range 1150-2250 nm based on the measurements collected on a double integrating spheres system combined with unscattered transmittance measurements. Pig skin optical properties are dominated by the dermis characteristics because of relatively big thickness (up to 4 mm compared to the 150 μm of the epidermis). Absorption coefficient spectra is dominated by water, while scattering coefficient spectra showed a steady decrease with increasing wavelength, except at strong absorption bands related to water. Quite stable anisotropy factor spectra for each layer were obtained, although also some signatures were observed at strong absorption bands. Sample thickness has showed to be a critical parameter in the measurement and estimation procedure. Epidermis samples were found difficult to prepare with an adequate thickness that would enable the estimation of the bulk of optical properties of this layer without the interaction of the dermis in the measurements.

The optical characterization of the pig skin, reported in this study, will provide users basic information to understand the individual effects of absorption, scattering and angular scattering distribution of NIR light through

the tissue. Moreover, the data reported here can be used for simulating the effect of different instrumental design factors or data modelling strategies in the quality and predictive performance of non-destructive NIRs analysis.

Acknowledgements

This study was carried out at the University of Leuven (KU Leuven) while Eduardo Zamora-Rojas was a visiting PhD student. He acknowledges the financial support of the Spanish Ministry of Education as a fellow of the Program “Training of University Teachers” (Formación del Profesorado Universitario, FPU). Ben Aernouts and Wouter Saeys are respectively funded as aspirant and postdoctoral fellow of the Research Foundation–Flanders (Brussels, Belgium). This work was financed by the research projects: n° P09-AGR-5129 (Research Excellence Program of the Andalusian Regional Government). The authors are grateful to the Spanish Protected Designation of Origin Los Pedroches and to the Spanish iberian pork industry COVAP S.C.A. for providing experimental materials. Thanks are given to the Department of Biology, Animal Physiology and Neurobiology Section (KU Leuven) for their advice and assistance to prepare the samples.

References

- Arimoto, H., Egawa, M., & Yamada, Y. (2005). Depth profile of diffuse reflectance near-infrared spectroscopy for measurement of water content in skin. *Skin Research and Technology*, *11*, 27-35.
- Bashkatov, A.N., Genina, E.A., & Tuchin, V.V. (2011). Optical properties of skin, subcutaneous and muscle tissues: a review. *Journal of Innovative Optical Health Sciences*, *4* (1), 9-38.
- Bashkatov, A.N., Genina, E.A., Kochubey, V.I., Stolnitz, M.M., Bashkatova, T.A., Novikova, O.V., Peshkova, A.Y., & Tuchin, V.V. (2000). Optical properties of melanin in the skin and skin-like phantoms. *Proceedings of SPIE*, *4162*, 219-226.
- Cain, A., Milner, T., Telenkov, S., Schuster, K., Stockton, K., Stolarski, D., Condit, C., & Rockwell, B. (2004). Porcine skin thermal response to near-IR lasers using a fast infrared camera, In S.L. Jacques, & P.W. Roach, (Eds.), *Laser Interaction with tissue and cells*. (pp. 313-324). SPIE, Bellingham, WA.
- Ding, H., Lu, J.Q., Jacobs, K.M., & Hu, X. (2005). Determination of refractive indices of porcine skin tissues and intralipid at eight wavelengths between 325 and 1557 nm. *Journal of the Optical Society of America*, *22* (6), 1151-1157.
- Du, Y., Hu, X.H., Cariveau, M., Ma, X., Kalmus, G.W., & Lu, J.Q. (2001). Optical properties of porcine skin dermis between 900 nm and 1500 nm. *Physics in Medicine and Biology*. *46*, 167-181.
- Inio, K., Maruo, K., Airomo, H., Hyodo, K., Nakatani, T., & Yamada, Y. (2003). Monte Carlo simulation of Near Infrared Reflectance Spectroscopy in the wavelength range from 1000 nm to 1900 nm. *Optical Review*, *10* (6), 600-606.
- Ma, X., Lu, J.Q., Ding, H., & Hu, X.H. (2005). Bulk optical parameters of porcine skin dermis at eight wavelengths from 325 to 1557 nm. *Optics Letters*, *30* (4), 412-414.
- Martelli, F. (2012). An ABC of near infrared photon migration in tissues: the diffuse regime of propagation. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, *20*, 29-42.
- Pérez-Marín, D., De Pedro, E., Guerrero-Ginel, J.E., & Garrido-Varo, A. (2009). A feasibility study on the use of near-infrared spectroscopy for prediction of the fatty acid profile in live Iberian pigs and carcasses. *Meat Science*, *83*, 627-633.
- Pérez-Marín, D., Fearn, T., Guerrero-Ginel, J.E., & Garrido-Varo, A. (2010). Robustness in pig fat NIRS calibrations by orthogonal projection. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, *100* (1), 36-40.

Pérez-Marín, D., Garrido-Varo, A., De Pedro, E., & Guerrero-Ginel, J.E. (2007). Chemometric utilities to achieve robustness in liquid NIRS calibrations: application to pig fat analysis. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 87, 241-246.

Pickering, J.W., Prah, S.A., van Wieringen, N., Beek, J.F., Henricus, J.C., Sterenborg, M., & van Gemer, M.J.C. (1993). Double integrating-sphere system for measuring the optical properties of tissue *Applied Optics*, 32 (4), 399-410.

Prah, S.A. (2010). Everything I think you should know about Inverse Adding Doubling. <http://omlc.ogi.edu/software/iad>. Accessed on 06/06/2012.

Prevolnik, M., Candek-Potokar M., & Skorjanc, D. (2004). Ability of NIR spectroscopy to predict meat chemical composition and quality-a review. *Czech Journal of Animal Science*, 49 (11), 500–510.

Prieto, N., Roeh, R., Lavín, P., Batten, G., & Andrés, S. (2009). Application of near infrared reflectance spectroscopy to predict meat and meat products quality: a review, *Meat Science*, 83, 175–186.

Renaudeau, D., Leclercq-Smekens, M., & Herin, M. (2006). Differences in skin characteristics in European (Large white) and Carribean (Creole) growing pigs with reference to thermoregulation. *Animal Research*, 55, 299-217.

Tuchin, V.V. (2007). Methods and algorithms for the measurement of optical parameters of tissues. In V.V. Tuchin (Ed.), *Tissue optics: light scattering methods and instruments for medical diagnosis* (2nd edition). (pp. 143-256). SPIE. Washington, USA.

Wang L, Sharma S, Aernouts B, Ramon H, Saeys W (2012) Supercontinuum laser based double-integrating-sphere system for measuring optical properties of highly dense turbid media in the 1300-2350nm region with high sensitivity. In: Popp, Drexler, Tuchin & Matthews (eds.) Proceedings of the Society of Photo-Optical Instrumentation Engineers, 8427 (pp. 1-8). SPIE Photonics Europe.

Weeranantanaphan, J., Downey, G., Allen, P., & Sun, D.W. (2011). A review of near infrared spectroscopy in muscle food analysis: 2005–2010, *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 19, 61–104.

Zamora-Rojas, E., Garrido-Varo, A., De Pedro-Sanz, E., Guerrero-Ginel, J.E., & Pérez-Marín, D. (2013a). Prediction of fatty acid content in pig adipose tissue by near infrared spectroscopy: at-line versus in-situ analysis. *Meat Science*, submitted.

Zamora-Rojas, E., Aernouts, B., Garrido-Varo, A., Pérez-Marín, D., Guerrero-Ginel J.E., & Saeys, W. (2013b). Double Integrating Spheres

Measurements for Estimating Optical Properties of Pig Subcutaneous Adipose Tissue. *Food and Bioprocess Technology*, submitted.

5.5.3. Characterization of diffuse reflectance near-infrared spectroscopy for non-invasive pig skin measurements

Eduardo Zamora-Rojas^{1*}, Ana Garrido-Varo¹, Ben Aernouts², Dolores Pérez-Marín¹, Wouter Saeys², Yukio Yamada³ and José Emilio Guerrero-Ginel¹

¹ Department of Animal Production, Non-Destructive Spectral Sensor Unit, Faculty of Agricultural and Forestry Engineering, University of Córdoba, Agrifood Campus of International Excellence (ceiA3), Campus Rabanales, N-IV, km 396, Córdoba, 14014, Spain.

² Department of Biosystems, Division of Mechatronics, Biostatistics and Sensors, University of Leuven, Kasteelpark Arenberg 30, Leuven, 3001, Belgium.

³ Department of Mechanical Engineering and Intelligent Systems, University of Electro-Communications, Chofu, Tokyo, 182-8585, Japan.

* Corresponding author: e.zamora@uco.es

Abstract

Non-invasive and non-destructive analysis based on Near Infrared Reflectance Spectroscopy (NIRS) sensors are used for the development of quality control systems in numerous *in-situ*/on-line applications from biomedicine to the agri-food industry. However, few studies have been done in investigating and understanding how the light propagates in the tissues. In this paper, we characterized the diffuse reflectance spectra of iberian pig skin detected at different source-detector distances in the wavelength range from 1150 nm to 1850 nm based on a Monte Carlo method. Average photon visit depth and fraction of absorbed energy captured by the detector indicated that most of the absorption was due to dermis layer. Nevertheless, large source-detector distances enabled to go deeper in the skin tissue, maximizing the sensitivity of the captured signal to the subcutaneous adipose tissue. An experiment to validate the simulation results was also conducted using spatially resolved spectroscopy showing good agreement between simulations results and real measurements.

Keywords: Monte Carlo; Simulation; Near-infrared Spectroscopy; Light propagation; Spatially Resolved Spectroscopy; Skin; Pig.

1. Introduction

Near Infrared Reflectance Spectroscopy (NIRS) has been investigated for multiple non-invasive *in vivo* measurements, especially in medical applications (Batten, 2012), since NIR radiation can penetrate into tissues offering a potential spectral window without the hazards of ionizing radiation. This interest has also appeared in the agri-food sector which is moving from at-line analysis based mainly in ground and minced products to *in-situ*/on-line/in-field applications based on the intact analysis.

Concretely, in the meat industry and particularly in the pig sector, measurements taken through the skin of animals are an ideal implementation of NIR spectroscopic analysis in the livestock industry due to the ease, speed and economically-environmentally sustainable data collection. The *in vivo* analysis of pigs can be an alternative to the forbidden biopsies analysis used to decide about complementary feeding at the final rearing period, with the purpose of assuring homogeneous and constant quality of the final meat. Otherwise, *in-situ* analysis of intact carcasses at the process line of the slaughterhouse will enable the development of simple, fast and objective real-time decision-making support systems. However, a loss of performance has been observed in these kinds of NIRS applications compared to other analysis presentations. Concretely, live iberian pig NIRS analysis (i.e. spectra collected over the skin) for fatty acid profile prediction showed a decrease in the variability explained to 60-77 % (*in vivo*) or 31-94 % (carcass) from values above 96 % when it was the spectra collected from melted subcutaneous adipose tissues (Pérez-Marín et al., 2007; 2009).

This is partly due to the fact that the light has to travel through the skin (epidermis and dermis) before reach the target layer (subcutaneous adipose tissue) and, therefore, this influences the measurements. Absorption and scattering characteristics of the tissues affect the light penetration which is still unknown in pig skin tissue. Although pioneering works have been published about *in vivo* NIRS applications for pork quality control, an interpretation of measured results are still somewhat unclear. Since the geometry of the optical fibers and the source-detector distance can significantly affect deep of penetration (Iino et al., 2002; Arimoto et al., 2005), the optical distance can maximize the sensitivity of the detected photons coming for the target layer.

In vitro experiment for determining the light penetration depth is quite difficult because it is almost impossible to make sliced tissue samples with successive thickness; therefore, the use of simulation methods of light transport in turbid media is very useful to do these studies (Iino et al., 2002; Arimoto et al., 2005). Monte Carlo (MC) method has been widely used for numerical simulation of photon propagation in strongly scattering media, such as biological tissues, since enables a rigorous, but flexible, numerical solution of the Radiative Transfer Equation (RTE) (Wang & Jacques, 1992). Basically,

this method launches a photon packet with an initial weight of unity perpendicularly to the tissue surface along the direction of the light beam. Then, a step size is chosen statically and some weight is lost by the photon packet at the end of each step due to the absorption properties of the system. The photon, with the remaining weight, is scattered and a new direction is statistically determined, according to the anisotropy factor of the tissue or phase function. Finally, when the photon weight is less than a threshold, a form of “Russian roulette” is used to determine if the photon packet ends or continues propagating (Tuchin, 2007).

In this study, we statistically calculate, based on a Monte Carlo method, the light penetration depth in the NIR region as a function of the source-detector distance for non-invasive pig skin measurements. Experimental Spatially Resolved Spectroscopy (SRS) measurements were studied to show the reflected light at different distances from the point illumination and verify the numerical simulation results.

2. Materials and methods

2.1. Structure and characteristics of pig skin

Pig’s skin is composed of three major layers with different structures: epidermis (blood free layer), dermis (vascularised layer with dense irregular connective tissue with collagenous fibres) and hypodermis (adipose tissue composed of two sub-layers separated by thin connective tissue) (Figure 1). Renaudeau et al. (2006) reported that Creole pigs, a crossbreed of Iberian and Asian pigs (Lemus-Flores et al., 2001), had an average epidermis thickness of 55 μm and a dermis of 3.82 mm using an image system. Concerning hypodermis or subcutaneous adipose tissue, this layer thickness depends on the body site.

Knowing optical properties of each individual layer is important in order to simulate light propagation in the tissue. Several authors have optically characterized pig skin (Bashkatov et al. (2011) have reviewed them); however, only Zamora-Rojas et al. (2013a and 2013b) have reported the bulk of optical properties (absorption coefficient (μ_a), scattering coefficient (μ_s) and anisotropy factor (g)) for a wide NIR wavelength range and for the three main skin layers (Figure 2). Concerning refractive indexes of the different layers, an average value of 1.41 can be considered for pork epidermis and 1.36 for pork dermis (Ding et al., 2005) in the studied wavelength range. Subcutaneous

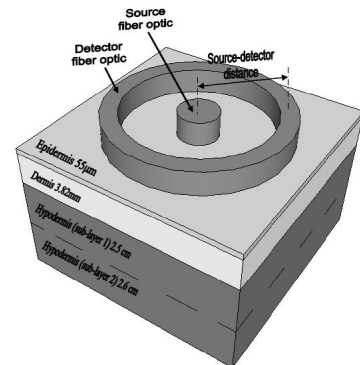


Figure 1. Schematic diagram of a pig skin cross section together with the MC simulated instrument configuration.

adipose tissue wavelength-dependency refractive index can be approximate by an equation (eq. 1) calculated by Cheng et al. (2002) based on four laser wavelengths:

$$n(\lambda) = A + B\lambda^{-2} + C\lambda^{-4} \quad (\text{Eq. 1})$$

where λ is the wavelength in nanometres (nm) and A, B and C are different Cauchy coefficients. In the case of porcine adipose tissue, Cauchy coefficients of $A = 1.4753$, $B = 4.3902 \times 10^{-3}$ and $C = 0.92385 \times 10^{-8}$ were suggested.

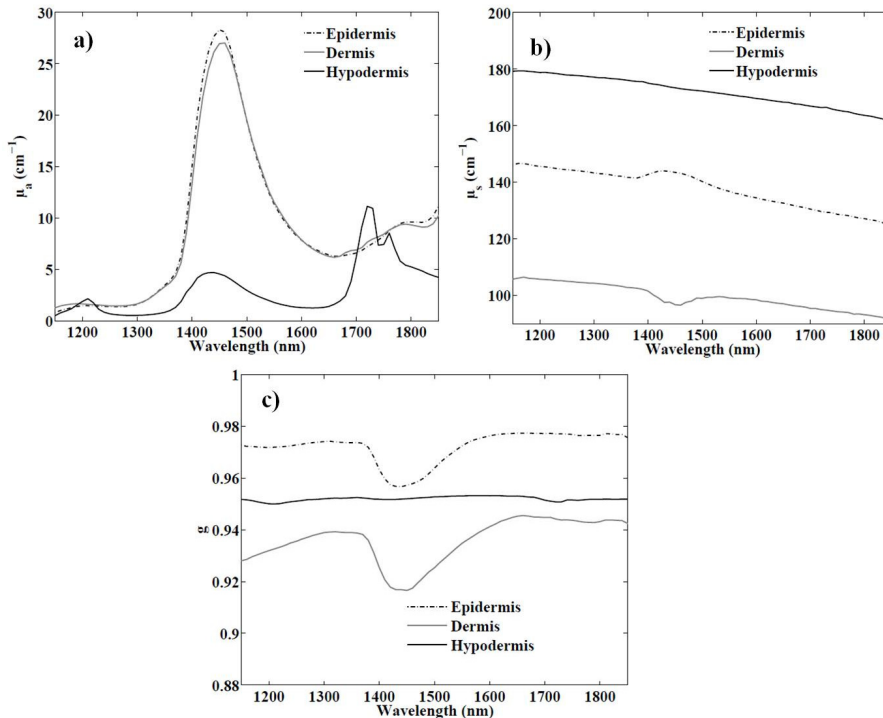


Figure 2. Optical properties for each pig skin layer reported by Zamora-Rojas et al. (2013a, 2013b) in the wavelength range 1150-1850 nm. a) absorption coefficient; b) scattering coefficient; c) anisotropy factor.

2.2. Monte Carlo simulation

A Monte Carlo (MC) method was used for simulation of light propagation through pig skin in the wavelength range 1150-1850 nm. Different input parameters have to be known: thicknesses, refractive index and optical properties of the different layers; the values described in section 2.1 were those used in the simulation.

In our simulation, the optical design simulated was that the source and detector are arranged concentrically with the source in the core and detector at the annulus (Figure 1). The simulation was designed in the way that the detector area detects only the photons whose incidence angle are lower than 11.5 degree, corresponding to the optical fiber's numerical aperture of 0.2.

Since the Monte Carlo simulation is a statistical method, a large number of photons (translated in a time-consuming procedure) is required to obtain reliable results. In our case, 1,000,000 photons were launched. Nevertheless, the MC algorithm used in this study has been previously validated showing enough agreement between experimental and statically calculated results (Iino et al. 2003; Arimoto et al., 2005).

Optical fibers were simulated with a diameter of 600 μm , while the source-detector distance was varied from 0.6 to 5.4 mm with a step of 0.6 mm.

2.3. Spatially spectra profile of non-invasive NIRS pig skin measurements

A novel XYZ translate stage (ThorLabs Inc., New Jersey, USA) setup for spatially resolved spectroscopy (Figure 3) was used for non-invasive NIR pig skin measurements with different distances between source and detector. A fixed contact probe (diameter: 600 μm and numerical aperture: 0.22. Romack Inc., Williamsburg, USA) was used as illuminating fiber and a parallel one, which can be moved at various precise distances from the illuminating fiber, was the fiber to collect the diffuse reflected light connected to the spectrometer working in the spectral range 400 – 1700 nm (Zeiss Corona VIS NIR 1.7, Carl Zeiss AG., Jena, Germany). The setup is composed of an Avalight 10W tungsten halogen light source (Avantes BV., Apeldoorn, The Netherlands). A fiber optical switch (Leoni Fiber Optics GmbH., Neuhaus-Schierschnitz, Germany) was used to switch between sample and reference measurements. A neutral density filter (NDF, Qioptiq, Luxembourg) of 3.0 optical density was used to prevent detector saturation during system calibration.

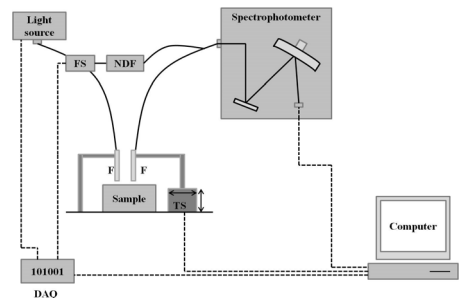


Figure 3. Schematic diagram of the translation stage SRS setup. FS: fiber switch; F: fibre optic probe; NDS: Neutral Density Filter; TS: translation stage; DAQ: Data acquisition card.

Automatic control of the system was obtained through a purpose-designed program in LabView 8.5 (National Instruments, Austin, TX).

Twenty five *in-vitro* iberian pig skin (composed of epidermis, dermis and subcutaneous adipose tissue) samples with a size of 5x5x3 cm³ were measured in the SRS system. Samples were collected at a Spanish slaughterhouse, frozen in liquid nitrogen and storage at -20 °C until 24 hours before the analysis. The source-detector distances used in the experiment varied from 1.2 mm to 4.8 mm, with an step of 0.6 mm.

3. Results and discussion

A detailed characterization of the pig skin is essential to obtain reliable simulation results. Porcine subcutaneous adipose tissue becomes separated into two different layers (outer and inner) with a different structure, chemical composition, texture and spectra characteristics as a function of distance from skin (Daza et al., 2007; Lyndgaard et al., 2011). In the case of iberian pigs which have a large thickness of the subcutaneous adipose tissue, although it can depend on the breeding, feeding regime and body site, an average value of 51 mm (near the tail insertion area) was observed. The outer adipose sub-layer had a thickness of 25 mm, while the inner sub-layer was 26 mm (similar results to Dobao et al. 1987). This is important in order to do the simulations and obtain a profile as a function of the distance from the skin. However, the expected light penetration depth in the subcutaneous adipose tissue may be not so large since dermis thickness is quite large (i.e. 3.82 mm).

3.1. Monte Carlo simulation of light propagation in pig skin

Figure 4 shows the average photon visit depth tracking only detected photons and calculated as the average grid element in the simulation which absorbed energy captured by the detector but part of energy was still divided in a new direction for its propagation. It was observed a decrease in the average photon visit depth at the wavelength range around 1450 nm in agreement with the strong absorption coefficients in epidermis and dermis in this range due to water. This indicates that the light depth was also influence fairly by the absorption coefficients of the tissue. When the source-detector distance was 3.6 mm or larger, in the above mentioned water-related absorption band, the simulated MC results failed in the average photon visit depth estimation due to the strong absorption and probably low detected signals. It was also observed that the average visit depth deeper at around 1200 nm, an absorption band related to water but also to lipids, when the source-detector distance increased. Nevertheless, independently of the source-detector distance, the average visit depth in the 1150-1850 nm region was found to remain in dermis (3.8 mm), although in general as the source-detector distance increased, the average photon visit depth increased.

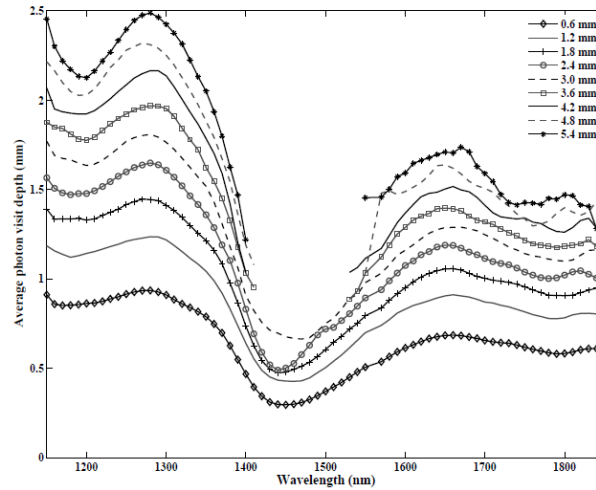


Figure 4. Average photon visit depth for different source-detector distances.

Figure 5 shows the fraction of energy absorbed at each layer without considering the effect of the source-detector distance. These simulation results indicate the theoretical percentages of photons absorbed by the different layers. It was observed that larger absorption percentages occurred in the dermis, although in the water absorption peak around 1440 nm epidermis had a big influence. Subcutaneous adipose tissue absorbed photons mainly at short NIR wavelengths between 1150 and 1340 nm and a little at 1550-1850 nm. This indicates that the light penetration depth was strongly influence by the absorption coefficients of the tissue.

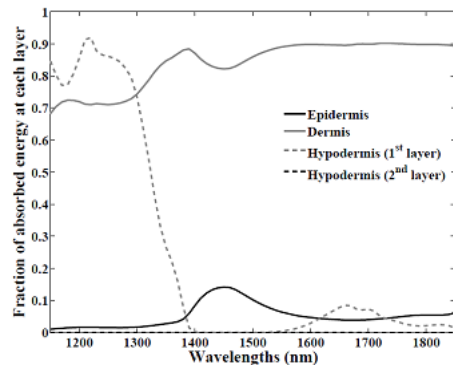


Figure 5. Fraction of absorbed energy at each layer for the wavelength range 1150-1850 nm. Hypodermis values have been multiplied by a factor of 10 times for the graph.

Figure 6 shows the percentage of absorbed energy captured by the detector at each layer as a function of the source-detector distance. It means the percentage of the absorbed energy captured by the detector by each layer compared to the total absorbed energy captured. In general, around 94 % of the total energy absorbed captured by the detector became from the dermis layer, except in the water-related wavelengths around 1440 nm which was dominated by the epidermis. Subcutaneous adipose tissue contributed to the

total detected signal with less than the 3 %, depending on the source-detector distance and wavelength.

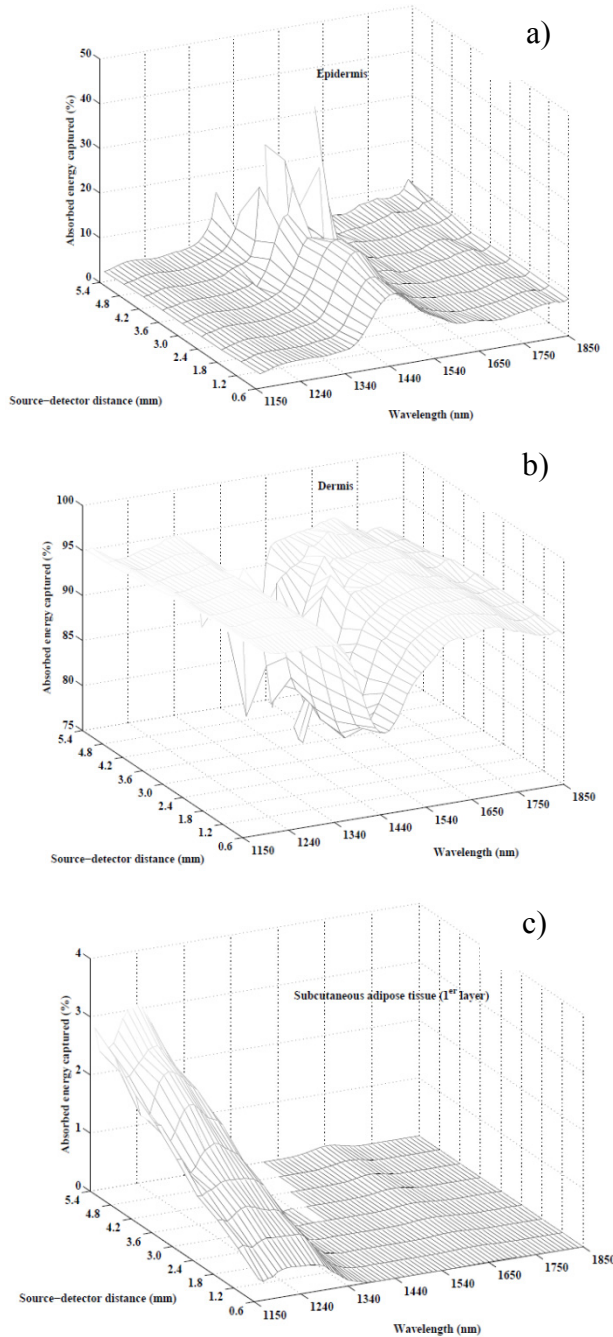


Figure 6. Percentage of absorbed energy captured by the detector as a function of the source-detector distance. a) epidermis; b) dermis; c) subcutaneous adipose tissue (1st layer); d) subcutaneous adipose tissue (2nd layer).

Slightly different tendency was found depending on the wavelength range in function of the source-detector distance: short NIR wavelengths will refer in the text to 1150-1400 nm, water NIR wavelengths to 1400-1580 nm and long NIR wavelengths to 1580-1850 nm. In the case of epidermis (Figure 6a), at short NIR wavelengths the absorbed energy captured by the detector was almost constant (3 %) concerning source-detector distance, while at the water NIR wavelengths increased as source-detector distance increased and at long NIR wavelengths was observed an slightly increased (from average 7 % to 11 %). Dermis layer (Figure 6b) absorbed most of the energy detected except for the water-related band at around 1440 nm. However, as source-detector distance increased, it was observed a slightly decreased in the percentage of absorbed energy captured. Figure 6c and 6d shows the simulation results for the absorbed energy captured by the detector as a function of the source-detector distance for the two subcutaneous adipose tissue sub-layers. Not energy reached the detector coming from the second sub-layer in any case; however as larger source-detector distance the contribution of the first subcutaneous adipose layer passed from 0.3 % to 3 % at 1150-1340 nm.

For larger source-detector distances, the average photon visit propagation went deeper and the contribution to the detected signal of the subcutaneous adipose tissue (i.e. target layer containing fatty acid profile information) was higher. Nevertheless, the signal was dominated in all the cases by the structure and composition of the dermis layer. This may indicate that NIR measurements collected *in vivo* for fatty acid prediction in iberian pig animals, which showed suitable performance considering the on-farm application but lower than other analysis modes such as directly intact adipose tissue analysis (Pérez-Marín et al., 2009), would be based on spectra information coming from the dermis instead of the subcutaneous adipose tissue that was used for reference analysis in the calibration. Nevertheless, dermis layer is composed by fat that may be related in somehow with the one present in the subcutaneous adipose tissue.

Another important aspect is that increasing source-detector distance enabled a deeper light propagation but the diffuse reflectance signal may be too low. Figure 7 shows the simulated diffuse reflectance spectra captured by the annulus detector as a function of the source-detector distance. As it can be seen, the reflectance spectra in the 1150-1850 nm range were dominated by water absorption. Conforming source-detector distance increased; there was a decline in the diffuse reflectance spectra values being in the case of distances larger than 2.4 mm almost flat the spectra shape above 1340 nm. These results are relevant for NIR sensor developers interesting in non-invasive applications since they can have an idea of how the spectra changes in relation to one of the main design factors that they have to consider.

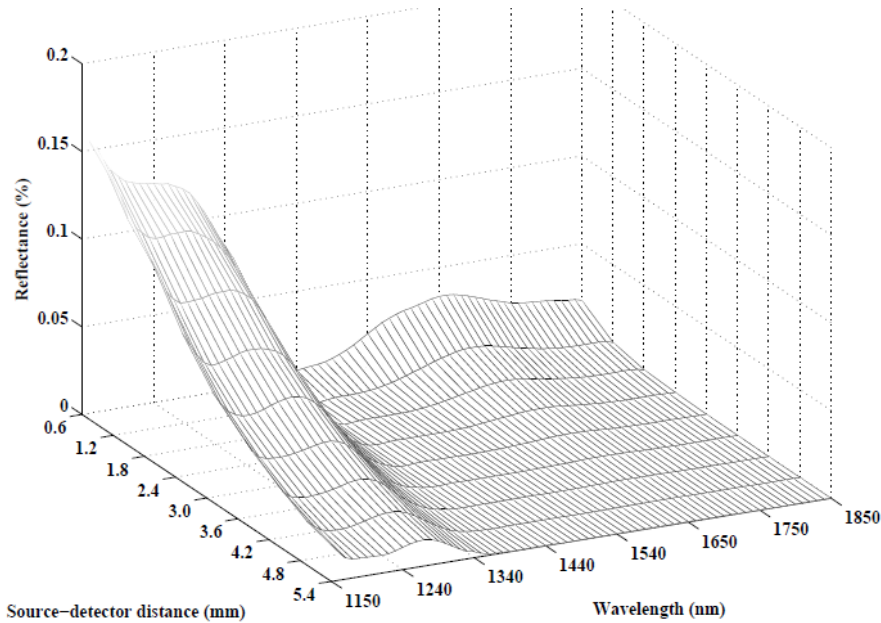


Figure 7. Monte Carlo estimated diffuse reflectance spectra of iberian pig skin as a function of the source-detector distance.

3.2. Spatially diffuse reflectance NIR spectra of pig skin

In order to validate the MC simulations results, the spatially resolved reflectance spectra of 25 iberian pig skin samples were collected for different source-detector distances. Figure 8a shows the average spectra in the visible and NIR region (450-1700 nm) measured in the SRS system, while Figure 8b shows a zoom in the common wavelength range used in our simulations after scaling the reflectance values (1150-1700 nm). A scaling factor, calculated as the ratio between the annular detector area of the MC simulation for each source-detector distance and the area of the point detector of the SRS system, was applied to the SRS profile in the NIR region in order to make more realistic the comparison between simulation and experimental results. This is due to the SRS experiment was design with an unique detector point with an area of 0.00282 cm^2 , while in our MC simulations an annual detector configuration surrounding the source point was used (Figure 1); therefore, the MC detector area changed depending on the distance between source and detector.

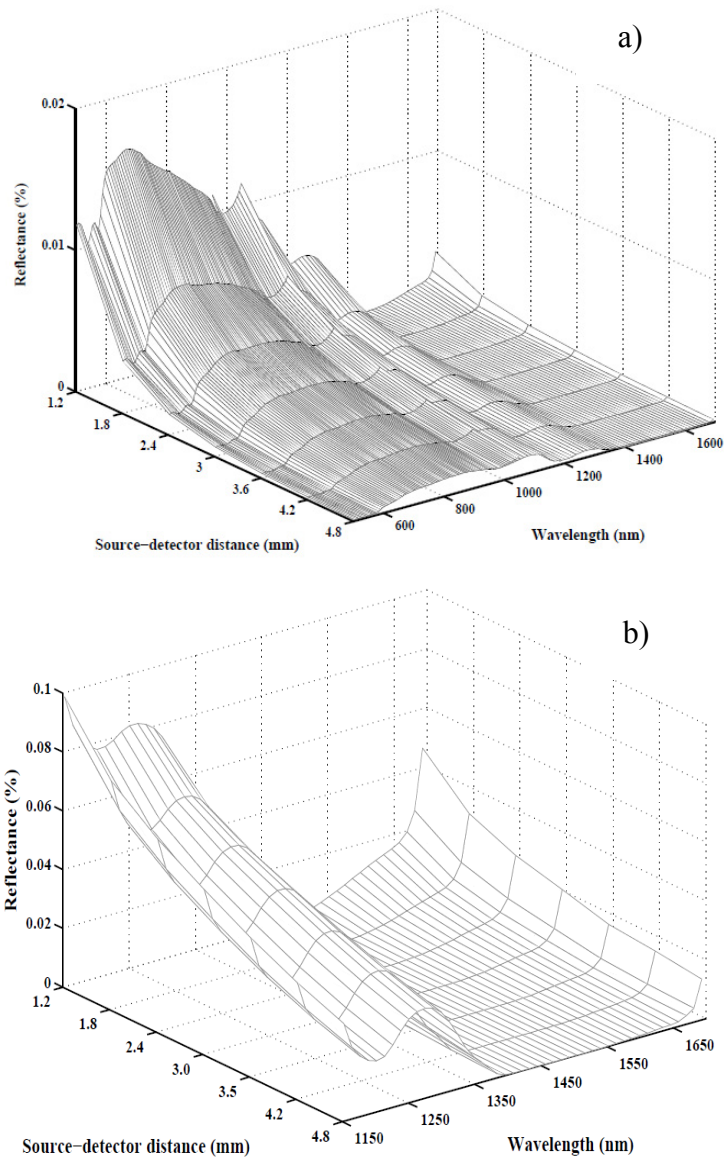


Figure 8. Average spatially resolved diffuse reflectance spectra of iberian pig skin for different source-detector distances. a) visible and NIR regions; b) NIR region (scaled values to consider the same optical configuration as in the MC simulations).

In general, as in our MC simulation results, it was observed a decline in the SRS reflectance values when increased the source-detector distance. The spectra were almost flat in the region of interest of this paper (1150-1700 nm) for a distance equal or above 2.4 mm. Visible and NIR reflectance spectra measured over iberian pig skin samples were dominated by absorption bands related to deoxy-hemoglobin and oxy-hemoglobin in the visible region (560

and 580 nm, respectively) and water in the NIR region (around 900, 1200 and 1400-1580 nm) (Figure 8a).

Figure 7 and Figure 8b show MC simulated and scaled experimental SRS diffuse reflectance spectra of *in vitro* iberian pig skin samples in the NIR region, respectively. Spectra shape in the common range 1150-1700 nm showed a good agreement between figures, although in the case of experimental measurements the absorption band related to water was broader. Once the diffuse reflectance values measured by the point-detector (Figure 8a) of the SRS system were scaled to estimate the same detector area of the MC simulations (annulus) in the wavelength range 1150-1700 nm (Figure 8b), a good agreement was also observed between both in relation to the reflectance values. Fiber optics used in the SRS experiment and in the simulation had practically the same numerical aperture so the effect that the critical angle can have in the diffuse reflectance values were solved since as the critical angle increases, the diffuse reflectance increases because the number of photons entering in the detector is larger. Nevertheless, other parameters such as average photon visit depth or the fraction of absorbed energy at each layer, discussed in the above section, are independent of the numerical aperture of the detector since light reaching the detector is scattered almost isotropically after many scattering events (Inio et al., 2003).

The SRS profile measured of *in vitro* pig skin samples showed an enough agreement with the simulation results to validate the observation presented and discussed in this study based on a Monte Carlo method.

4. Conclusions

Diffuse reflectance NIR spectroscopy in iberian pig skin was investigated and characterized for different source-detector distances based on a Monte Carlo method with an optical configuration where the source fiber optic was located in the center surrounding by an annular detector fiber optic. Monte Carlo simulation results showed that large source-detector distances enabled to go deeper in the skin tissue, maximizing the sensitivity of the captured signal to the subcutaneous adipose tissue. Nevertheless, average photon visit depth and fraction of energy absorbed results indicated that most of the absorption was due to dermis layer. A compromised decision should be taken for the distance between source and detector since larger distances enabled to go deeper in the tissue but the simulated and experimental SRS diffuse reflectance spectra of iberian pig skin showed broader absorption bands for larger source-detector distances. Further work will be interesting to do in shorter NIR wavelengths since the water absorption may not be as dominant as in long wavelengths larger than 1400 nm hiding any other chemical or physical information.

Acknowledgements

Eduardo Zamora-Rojas acknowledges the financial support of the Spanish Ministry of Education as a fellow of the Program “Training of University Teachers” (Formación del Profesorado Universitario, FPU). Ben Aernouts and Wouter Saeys are respectively funded as aspirant and postdoctoral fellow of the Research Foundation–Flanders (Brussels, Belgium). This work was financed by the research projects: n° P09-AGR-5129 (Research Excellence Program of the Andalusian Regional Government). The authors are grateful to the Spanish Protected Designation of Origin Los Pedroches and to the Spanish iberian pork industry COVAP S.C.A. for providing experimental materials.

References

Arimoto H, Egawa M & Yamada Y (2005) Depth profile of diffuse reflectance near-infrared spectroscopy for measurement of water content in skin. *Skin Research and Technology*, 11, 27-35.

Bashkatov AN, Genina EA & Tuchin VV (2011) Optical properties of skin, subcutaneous and muscle tissues: a review. *Journal of Innovative Optical Health Sciences*, 4 (1), 9-38.

Batten G (2012) Special issue: medical application. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 20 (1).

Cheng S, Shen HY, Zhang G, Huand CH & Huang XJ (2002) Measurement of the refractive index of biotissue at four laser wavelengths. *Proceedings of SPIE*, 4916. 172-176.

Daza A, Ruiz-Carrascal J, Olivares A, Menoyo D & López-Bote GJ (2007) Fatty acids profile of the subcutaneous backfat layers from iberian pigs raised under free-range conditions. *Food Science and Technology International*, 13 (2), 126-140.

Ding H, Lu JQ, Jacobs KM & Hu X (2005) Determination of refractive indices of porcine skin tissues and intralipid at eight wavelengths between 325 and 1557 nm. *Journal of the Optical Society of America*, 22 (6), 1151-1157.

Dobao MT, Rodriganez J, Silio L, Toro MA, De Pedro E & García de Siles JL (1987) Crecimiento y características de canal en cerdos ibéricos, duroc-jersey x ibérico y jiaxin X ibérico. *Investigación Agraria*, 2 (1), 9-23.

Inio K, Maruo K, Airomo H, Hyodo K, Nakatani T & Yamada Y (2003) Monte Carlo simulation of Near Infrared Reflectance Spectroscopy in the wavelength range from 1000 nm to 1900 nm. *Optical Review*, 10 (6), 600-606.

Lyndgaard LB, Sørensen KM, van den Berg FV & Engelsen SB (2011) Depth profiling of porcine adipose tissue by Raman spectroscopy. *Journal of Raman Spectroscopy*, 43(4), 482-489.

Pérez-Marín D, De Pedro E, Guerrero-Ginel JE & Garrido-Varo A (2009) A feasibility study on the use of near-infrared spectroscopy for prediction of the fatty acid profile in live iberian pigs and carcasses. *Meat Science*, 83, 627-633.

Pérez-Marín D, Garrido-Varo A, De Pedro E & Guerrero-Ginel JE (2007) Chemometric utilities to achieve robustness in liquid NIRS calibrations: application to pig fat analysis. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 87, 241-246.

Renaudeau D, Leclercq-Smekens M & Herin M (2006) Differences in skin characteristics in European (Large white) and Caribbean (Creole) growing pigs with reference to thermoregulation. *Animal Research*, 55, 299-217.

Tuchin, VV (2007). Methods and algorithms for the measurement of optical parameters of tissues. In VV Tuchin (Ed.) *Tissue optics: light scattering methods and instruments for medical diagnosis* (2nd edition) (pp. 143-256). SPIE. Washington, USA.

Wang L & Jacques SL (1992) Monte Carlo modeling of light transport in multi-layered tissues in standard C. Available at: <http://labs.seas.wustl.edu/bme/wang/mcr5/mcman.pdf>. Accessed: 12 November 2012.

Zamora-Rojas E, Aernouts B, Garrido-Varo A, Saeys W, Pérez-Marín D & Guerrero-Ginel JE (2013b) Optical Properties of Pig Skin Epidermis and Dermis Estimated with Double Integrating Spheres Measurements. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, submitted.

Zamora-Rojas E, Aernouts B, Garrido-Varo A, Guerrero-Ginel JE, Pérez-Marín D & Saeys W (2013a) Double Integrating Spheres Measurements for Estimating Optical Properties of Pig Subcutaneous Adipose Tissue. *Food and Bioprocess Technology*, submitted.

5.6. Diseño de plataformas de apoyo a la toma de decisiones en la industria del cerdo ibérico basadas en la tecnología NIRS

Las diversas ventajas de la espectroscopía del infrarrojo cercano han permitido que más del 50 % de las técnicas espectroscópicas usadas en el control de procesos en la industria (agroalimentaria, petro-química, textil, farmacéutica, etc.) estén basadas en la región del infrarrojo cercano (SMA, 2007). Además, la portabilidad de los nuevos diseños instrumentales disponibles en el mercado permite que aparezcan nuevos nichos de mercado para esta tecnología. De hecho, los avances tecnológicos en instrumentación NIRS han permitido la evaluación de aplicaciones *in situ* de control de calidad de productos de cerdo ibérico como se demuestra en diversos estudios de esta tesis doctoral (apartado 5.3).

No obstante, para que la implantación de esta tecnología sea una completa realidad en la industria de transformación del cerdo ibérico necesita del diseño de plataformas de apoyo a la toma de decisiones que faciliten el análisis e interpretación de los resultados obtenidos a los usuarios. Además, dichas plataformas verdaderamente permitirían que la tecnología NIRS pudiera ser un sistema de control de calidad en tiempo real.

La mayoría de las aplicaciones NIRS dependen de distintos software para el tratamiento de los datos recogidos. Actualmente, existen en el mercado una gran variedad de software de tratamiento multivariante de datos, pero muchos de ellos no son compatibles completamente con datos procedentes de otros equipos.

Como se ha mencionado en esta tesis doctoral, el equipo MEMS-NIRS evaluado cuenta con un software de tratamiento de datos muy limitado y hace aconsejable el diseñar y desarrollar un software propio adaptado. De esta forma, usuarios no expertos podrían realizar medidas, analizarlas e interpretarlas de una forma sencilla y rápida, poniendo en valor todo el trabajo realizado. Una opción posible se basa en el diseño y desarrollo de una interfaz gráfica de usuario (GUI, *Graphical User Interface*), ya que consiste en una serie de elementos que ayuda al usuario a comunicarse de forma sencilla con un sistema que puede tener incorporados distintos algoritmos de tratamiento y análisis de datos, en este caso espectrales.

Considerando estos aspectos, en esta sección se describe el diseño y desarrollo de una GUI, en entorno MATLAB[®], para el análisis de rutina de canales de cerdos ibéricos mediante equipos MEMS-NIRS portátiles en la línea de faenado. Las bases de datos y modelos descritos en la sección 5.3 son utilizados aquí. De esta forma, un operario no experto podría obtener predicciones, que después pueda integrar en una base de datos, para el diseño de un sistema de apoyo a la toma de decisiones en relación a la composición

en ácidos grasos y/o autenticación según régimen alimenticio de canales de cerdos ibéricos.

Partiendo de las bases de datos, modelos cualitativos y cuantitativos y resultados descritos en el apartado 5.3 para el control de calidad de canales de cerdo ibérico mediante equipos MEMS-NIRS en la línea de faenado, se ha diseñado un diagrama de flujo que sintetiza todo el procedimiento a seguir con este tipo de datos para esta aplicación concreta. La Figura 5.6.1 muestra dicho diagrama aplicado para el desarrollo de la GUI. Las distintas etapas de procesamiento de los datos espectrales conlleva la importación de los datos de este tipo de sensores, evaluar la repetibilidad espectral de las medidas, predecir cuantitativamente el perfil de ácidos grasos de las muestras analizadas, realizar un análisis cualitativo en base a la información espectral y obtener unos estadísticos que informen sobre la fiabilidad de la predicción. Además, en el diseño se incluye la posibilidad de mostrar al operario en tiempo real tanto los datos espectrales tratados como las predicciones obtenidas.

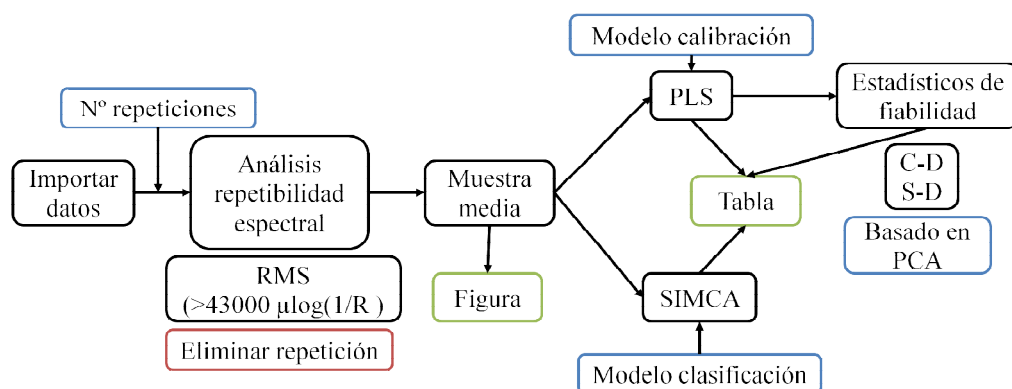


Figura 5.6.1. Diagrama de flujo de la interfaz gráfica de usuario diseñada para el análisis de datos espectroscópicos procedentes de equipos MEMS-NIRS portátiles.

A continuación se detallan las distintas etapas del análisis que se realiza en la GUI diseñada:

- Análisis de la repetibilidad espectral: basado en el estadístico RMS entre cada repetición de una muestra y la media del conjunto. Se estableció un límite de 43.000 $\mu\log(1/R)$ para eliminar espectros con baja repetibilidad, en base a los resultados del apartado 5.3. Es necesario, para realizar los cálculos, proporcionar el número de repeticiones por muestra. Una vez limpiada la librería, se procede a calcular el espectro medio de cada muestra.
- Predicción cualitativa con modelos SIMCA: se implementó el mejor modelo de clasificación en base a tres regímenes alimenticios (“bellota”, “recebo” y “cebo”) descrito en el apartado 5.3.2.

- Predicción cuantitativa con modelos PLS: se implementaron los modelos desarrollados en la publicación 5.3.3 con MATLAB® y PLS Toolbox para la predicción de la composición de ácidos grasos. Con los datos predichos para cada muestra, se estableció un modelo lógico basado en los niveles límites para cada régimen alimenticio establecidos en la Orden APA/3653/2007 (BOE, 2007b), para poder asignar a cada muestra una categoría comercial en base a su composición. No obstante, hay que tener en cuenta que esta forma de clasificación tiene sus limitaciones, al igual que en el caso de los análisis por GC, ya que se basa sólo en los límites arbitrarios de únicamente cuatro ácidos grasos para determinar la categoría a la que pertenece la canal.
- Estadísticos relacionados con la fiabilidad de las predicciones: se basan en los estadísticos GH y NH descritos anteriormente en esta tesis doctoral. La forma de cálculo se basa en el espacio definido por un análisis PCA para el colectivo de calibración, donde se proyecta las muestras nuevas desconocidas. Posteriormente, se calcula la distancia de Mahalanobis al centro de la librería de calibración de cada una de ellas (estadístico C-D: *Central-Distance*) y a la muestra del colectivo de calibración más cercana a ella (estadístico S-D: *Sample-Distance*). Los cálculos se basan en los valores de coordenadas (*scores*) de las componentes principales seleccionadas para cada muestra, tanto del colectivo de calibración como de las nuevas muestras a predecir. En esta GUI, el análisis PCA se realiza en base al colectivo de calibración de los modelos cuantitativos.

Con la estructura diseñada anteriormente, se procedió en entorno MATLAB® (ver 7.10, The Mathworks, USA) al diseño de la GUI (Figura 5.6.2) y al desarrollo del código de cálculo. En dicho código, se incluyeron algoritmos de la librería PLS Toolbox (ver 5.8, Eigenvector Research, Inc., USA) para el pretratamiento espectral, análisis PCA y modelos cuantitativos y cualitativos.

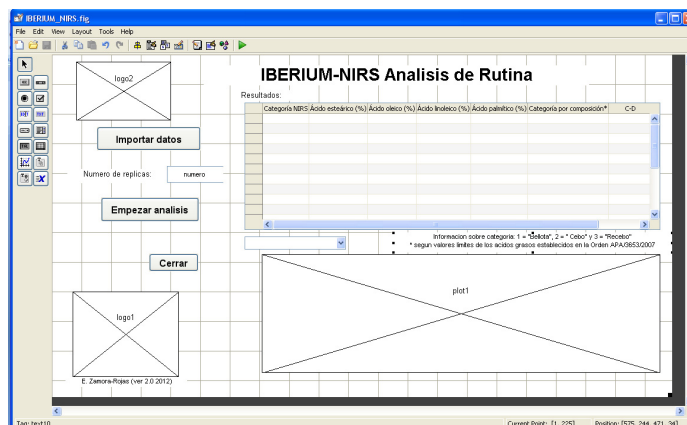


Figura 5.6.2. Esquema de diseño de la interfaz gráfica de usuario

La GUI muestra una tabla con los valores predichos obtenidos para cada muestra analizada y una figura donde se presentan los datos espectrales mediados para cada una de ellas. De esta forma, el usuario puede ver rápidamente los resultados del análisis. Además, el código genera un archivo (.txt) con toda la información disponible de cada muestra, que se guarda automáticamente en una carpeta seleccionada por el usuario. En la Figura 5.6.3, se muestra una imagen capturada de la GUI diseñada y compilada para poderse ejecutar en distintos ordenadores sin necesidad de tener instalado MATLAB® u otros programas de tratamiento matemático de datos. Este aspecto es bastante interesante para la distribución de la aplicación entre distintos usuarios.

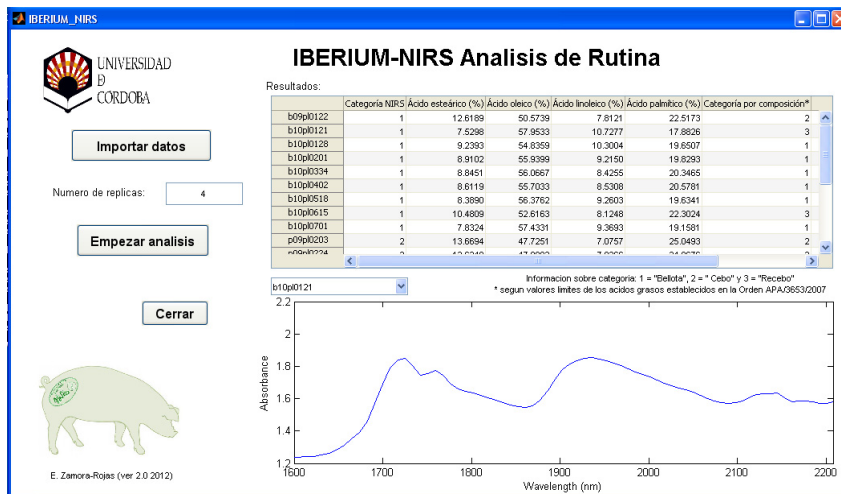


Figura 5.6.3. Disposición final de la interfaz gráfica de usuario

Esta GUI, denominada “IBERIUM-NIRS Análisis de Rutina”, permite por tanto, realizar un análisis de datos espectrales procedentes de equipos MEMS-NIRS portátiles de una forma sencilla, clara, consistente, intuitiva y coherente para aplicar distintos algoritmos matemáticos (PLS, SIMCA, PCA, etc.) que permitan predecir la composición de ácidos grasos de las muestras analizadas, así como calcular unos estadísticos asociados que informen sobre la fiabilidad de la predicción; además de clasificar cada individuo en base a su régimen alimenticio. Hay que tener en cuenta que este tipo de diseños y metodologías es extrapolable a otras aplicaciones NIRS.

De todos modos, para poder contar con un sistema de apoyo a la toma de decisiones en la industria del cerdo ibérico, dichos datos deben estar fácilmente disponibles en diversas plataformas o bases de datos para integrarse con otro tipo de información relevante que permita tomar decisiones de una forma rápida y eficaz. De hecho, no sólo es importante disponer de una tecnología rápida y sencilla para realizar el análisis, sino de herramientas informáticas simples y eficientes que permitan obtener la información útil de las mediciones y que se puedan acceder a ella de forma remota en distintas

plataformas. Adame-Siles (2012) desarrolló una aplicación android para dispositivos móviles inteligentes que permite, entre distintas funciones, subir archivos a servidores virtuales facilitando la computación a través de internet (*cloud computing*). Una adaptación de esta aplicación a nuestro caso, permitiría enviar al servidor virtual los datos espectrales medidos con el equipo MEMS-NIRS a través de un dispositivo móvil inteligente y analizar dichos datos en el servidor de forma remota mediante la GUI detallada en esta sección, para obtener, en tiempo real y en cualquier lugar, la información útil a la que puede acceder el usuario final.

No obstante, para el diseño de plataformas de apoyo a la toma de decisiones en tiempo real en la industria de transformación del cerdo ibérico es interesante incluir un entorno web que permita acceder fácilmente, y de forma remota, a toda la información generada. De hecho, en este apartado se ha diseñado un entorno web donde cualquier usuario puede acceder a los datos analizados mediante el control NIRS desarrollado (Figura 5.6.4)¹⁸. Además, en esta tesis doctoral se ha desarrollado una aplicación android, diseñada con el software AppInventor del Massachusset Institute of Technology¹⁹ (Figura 5.6.5), para poder acceder a dicho entorno virtual desde dispositivos móviles android. Esta aplicación móvil permite registrar/consultar los datos de cada animal en una base de datos, así como otras funciones de comunicación rápida entre usuarios (Figura 5.6.6). Todo esto pone de relieve el potencial de integrar sensores NIRS de última generación, para el control individual de canales de cerdo ibérico, con otras tecnologías de la información y la comunicación, que facilitan la automatización del análisis de datos, su acceso remoto en cualquier ubicación y la toma de decisiones de una forma simple, rápida, intuitiva y eficiente.

¹⁸ http://bit.ly/IberiumSATD_web

¹⁹ <http://www.appinventor.mit.edu/>



Figura 5.6.4. Portada del entorno web diseñado para acceder a las base de datos generadas con la información procedente de los análisis realizados con tecnología NIRS.

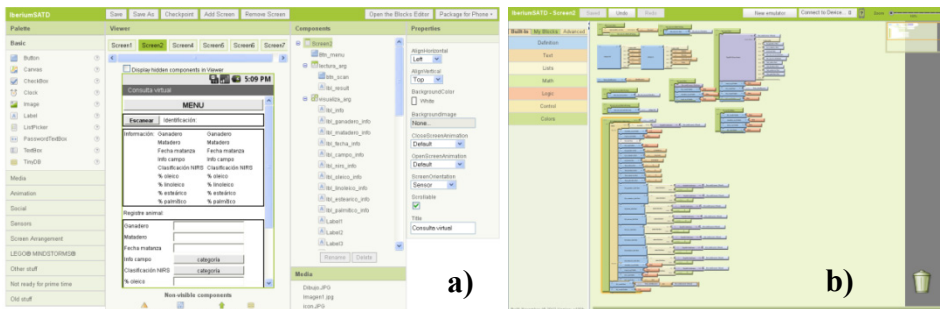


Figura 5.6.5 Entorno de diseño (a) y programación (b) del software App Inventor utilizado en el desarrollo de la aplicación android.



Figura 5.6.6. Aplicación android diseñada para generar/acceder a la base de datos virtual.

REFLEXIONES GENERALES Y RECOMENDACIONES PARA TRABAJOS FUTUROS DE I+D+i



6. Reflexiones generales y recomendaciones para trabajos futuros de I+D+i

Este capítulo se presenta con la intención de poner de manifiesto la sinergia y complementación de los estudios descritos en esta tesis doctoral, así como exponer otros aspectos económicos, legislativos y de mercado importantes para la implantación de la tecnología NIRS en la industria del cerdo ibérico, como herramienta innovadora en el control de calidad y certificación de sus productos derivados.

Los estudios abordados en esta tesis doctoral no sólo contemplan aspectos de investigación aplicada, sino que se abordan trabajos de investigación básica. Todos estos confluyen en el diseño, desarrollo, evaluación y optimización de metodologías de control de calidad de productos y procesos *in situ* en la industria de transformación del cerdo ibérico, mediante el empleo de sensores basados en la espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano.

Como se ha mencionado en el apartado 3.3.4, la implantación de la tecnología NIRS en el sector del cerdo ibérico es una realidad en cuanto a su implantación a nivel de laboratorio. No obstante, el trabajo de desarrollo de calibraciones y modelos robustos, aún precisa de investigación. En la presente tesis doctoral, se ha puesto a punto una metodología, evaluada en muestras de carne picada y grasas tanto fundidas como intactas (principales materias primas no elaboradas del cerdo ibérico), pero generalizable a otros productos, para supervisar, mantener y actualizar modelos cuantitativos NIRS, a un coste económico reducido, durante largos periodos de tiempo. De esta forma, la actualización de los modelos permitirá obtener predicciones en el control rutinario de estos productos con una adecuada fiabilidad. Un aspecto también a resaltar, dado el tamaño y variabilidad de las bases de datos empleadas en estos estudios es que los resultados obtenidos dan una información más ajustada de la precisión y exactitud del análisis NIRS de estos productos, cuando son analizados en monocromadores de altas prestaciones científico-técnicas en condiciones de laboratorio, en comparación con otros estudios previos realizados con bases de datos más reducidas.

Dados los actuales avances en instrumentación NIRS, parecía razonable, tras haber sido demostrado en investigaciones previas la viabilidad de esta tecnología para el análisis no destructivo de tejido adiposo subcutáneo en equipos de laboratorio con altas prestaciones científico-técnicas, estudiar el potencial del uso de equipos portátiles NIRS para el análisis *in situ* de canales de cerdo ibérico en la línea de faenado. En el apartado 5.3, se aborda esta cuestión tanto desde el punto de vista cualitativo (clasificación según el régimen alimenticio de los animales durante los 2 meses previos al sacrificio)

como cuantitativo (predicción de la composición en oleico, linoleico, palmítico y esteárico).

La elección del instrumento portátil evaluado en esta tesis se ha basado en un análisis de los equipos NIRS portátiles actualmente existentes en el mercado. La disponibilidad, precio, prestaciones funcionales como incorporación de microprocesador, características ópticas y espectrales, robustez, peso, tamaño y soporte técnico han sido las variables evaluadas para que finalmente el equipo PhazirTM fuera el elegido para esta tesis doctoral. De hecho, durante la elaboración de esta tesis doctoral, se contactó con la firma japonesa Soma Optics Ltd. para diseñar conjuntamente un estudio de evaluación del equipo NIRS “Fat Analyzer S-7010”²⁰. Aunque no se muestran los resultados en esta tesis doctoral, se concluyó que el mismo no era adecuado para los objetivos de la investigación a realizar.

La distinta instrumentación disponible en el mercado (variedad en diseños ópticos, rangos de longitudes de onda, resolución, portabilidad, etc.) hace que el coste de analizar una muestra intacta de grasa de cerdo ibérico pueda variar entre 8,6 a 2,9 €. La Tabla 6.1 muestra el coste estimado por muestra realizado con un instrumento NIRS de laboratorio (como Foss NIRSystems 6500) o uno portátil en la línea de faenado (como PhazirTM 1624). En los cálculos, se han tenido en cuenta variables como: coste instrumental, coste del software de adquisición de datos, amortización instrumental, tiempo de preparación de muestra y de análisis según el tipo de instrumento, coste de mano de obra, número de muestras analizadas por día y fungibles. También ha sido estimado el coste de desarrollo de un modelo cuantitativo para predecir el perfil de ácidos grasos con 200 muestras analizadas por vía química (GC). En este caso, también se incluyeron los costes de software de tratamiento de datos, mano de obra cualificada y con formación específica, análisis de referencia y coste analítico NIRS.

El punto de control donde establecer el análisis NIRS en la línea de faenado de canales de cerdo ha sido elegido partiendo de la experiencia adquirida durante los ensayos realizados en esta tesis doctoral, así como teniendo en cuenta los requerimientos de limpieza de la industria de transformación cárnica y el análisis de peligros y puntos de control críticos. El punto de control se estableció a la salida de las canales de la cámara de refrigeración, donde se olean al menos durante 2 horas. En ese punto, la temperatura del tejido adiposo subcutáneo está estabilizada, aspecto que puede influir en la calidad y repetibilidad espectral. Además, el análisis se produce tras la inspección veterinaria, de modo que no hay riesgo de contaminación entre canales aptas para el consumo y no aptas.

²⁰ http://www.somaopt.co.jp/english/fat_meat/s_7010.html

Tabla 6.1. Costes estimados de realizar un análisis NIRS de muestras de grasa de cerdo ibérico con instrumentos de laboratorio y portátiles.

	Instrumento de laboratorio (Foss NIRSystems 6500)	Instrumento portátil (Phazir™ 1624)
Instrumento + software de adquisición de datos (€)	48.000	29.000
Amortización (años)	10	6
Tiempo de preparación de muestra y análisis (minutos)	3 (muestra intacta de tejido adiposo)	1 (análisis en la canal)
Mano de obra no cualificada (€/hora)	8	8
Coste muestra (€/muestra)	8,6	2,9
Software análisis de datos (€)	8.000	3.750
Coste del análisis por GC de 200 muestras (€)	2.800	2.800
Análisis NIRS de 200 muestras (€)	1.729	578
Mano de obra cualificada (€/hora)	20	20
Coste modelo (€)	5.015	3.862

Los resultados de clasificación de canales de cerdo ibérico en tres regímenes alimenticios, como “bellota”, “cebo” y “recebo”, mediante el análisis con el equipo MEMS-NIRS en la línea de faenado, mostró el potencial de poder realizar un análisis rápido, simple, de bajo coste y con un alto porcentaje de canales correctamente clasificadas para las categorías de “bellota” y “cebo”. Asimismo, confirman que la clasificación de canales correspondientes a la categoría “recebo” unos errores de clasificación superiores a los anteriores.

Hay que tener en cuenta que la terminología usada en esta tesis doctoral, en relación a las categorías comerciales de los productos derivados del cerdo ibérico, se refieren a la actual Norma de Calidad del sector que está vigente desde el año 2007. No obstante, el MAGRAMA ya ha publicado el proyecto de modificación de dicha norma, que se espere que entre en vigor el 1 de marzo de 2014 (sección 3.1). En dicho proyecto, se modifican las denominaciones de las actuales categorías comerciales. En esencia, “bellota” y “cebo” no sufren modificaciones sustanciales, mientras que se modifica las especificaciones de la categoría “cebo de campo” para que unifique los actuales grupos de “recebo” y “cebo de campo”. Estos cambios en las denominaciones, en realidad, no suponen ningún cambio drástico en cuanto a los resultados obtenidos en esta tesis doctoral.

La predicción del porcentaje de oleico, linoleico, palmítico y esteárico *in situ* en la línea de faenado, tras analizar con un equipo portátil MEMS-NIRS la canal de cerdo ibérico, ha demostrado la posibilidad de obtener, de forma individual, una adecuada precisión de la composición lipídica de las canales. Los errores totales estimados indican la idoneidad de poder reemplazar el método de GC para el análisis de lotes de animales por el análisis individual NIRS *in situ* en la línea de faenado.

El análisis cualitativo y cuantitativo mediante espectrofotómetros MEMS-NIRS portátiles permite el análisis *in situ* en la industria de transformación del cerdo ibérico de canales individuales de una forma rápida, simple, sostenible, objetiva, económicamente eficiente, no destructiva y con una precisión y exactitud adecuada. Sin embargo, la comparación de estos instrumentos con otros de altas prestaciones científico-técnicas han indicado la necesidad de una adaptación específica de los mismos para una óptima incorporación en el control de calidad *in situ* de canales de cerdo en la línea de faenado. La obtención de espectros con una alta calidad espectral, representativos y que contengan información de utilidad es una cuestión esencial en la que diversos factores entran en juego como: tamaño de ventana, rango de longitudes de onda, resolución óptica, número de medidas por muestra/canal, tal como se ha puesto de manifiesto en los distintos estudios realizados en esta tesis doctoral. Estos aspectos son relevantes para los fabricantes de instrumentación NIRS que deben asumir riesgos para incorporar estas recomendaciones a la hora de invertir en I+D en un sector que *a priori* puede no ser atractivo, por lo local de su producción.

Los resultados alcanzados en esta tesis doctoral también demuestran la posibilidad de transferir bases de datos espectrales generadas durante varios años en equipos NIRS de laboratorio a equipos portátiles con un diseño óptico totalmente distinto. La metodología desarrollada y evaluada permite transferir dichas librerías sin que los modelos de calibración tengan una pérdida elevada de precisión, exactitud y robustez. El estudio de caso presentado en esta tesis doctoral se ha realizado con muestras de carne picada, principal materia prima utilizada en la fabricación de otros productos derivados del cerdo ibérico, aunque la metodología es extrapolable.

Un aspecto importante, que figura en la disposición tercera de la futura Norma de Calidad del sector del cerdo ibérico, hace referencia a la implantación/utilización, por parte de una industria, de un control analítico de la alimentación de los animales distinto de las inspecciones en campo realizadas por empresas acreditadas. Esta disposición regula que dicho procedimiento debe darse a conocer con anterioridad a los ganaderos para promover la transparencia y garantía del proceso. Además, en caso de descalificaciones, el ganadero deberá comunicarlo a la autoridad competente para que establezca unos criterios y dé un veredicto. Por ello, y para hacer frente a posibles conflictos, es imprescindible realizar un protocolo

normalizado para la utilización de la tecnología NIRS en el sector del cerdo ibérico, teniendo en cuenta las particularidades de este sector, al igual que se ha realizado en el control de calidad de piensos compuestos mediante tecnología NIRS con la norma ISO 12099:2010. En esa línea, se presenta esta tesis doctoral proporcionando algunas pautas sobre la incorporación de esta tecnología en el control de calidad de productos de cerdo ibérico en la industria de transformación.

El sector del cerdo ibérico se encuentra muy localizado geográficamente y puede que el número de mataderos y empresas de este sector sea reducido para que fabricantes de instrumentos y sensores NIRS dirijan sus líneas estratégicas de negocio hacia este sector e intenten incorporar las sugerencias que se plantean en estudios como los que incluye esta tesis doctoral. Pese a eso, hay que entender que la metodología y resultados aquí alcanzados son, en su mayor parte, extrapolables al sector del porcino blanco o industrial, que mueve mundialmente más de 106 toneladas de carne lo que se traduce en más de 123 miles de millones de euros. Este sector tiene una cuota de mercado para la implantación de sistemas de control *in situ* basados en tecnología NIRS mucho mayor que la del sector del cerdo ibérico. Además, dado que la Unión Europea ha acordado que el etiquetado obligatorio de productos agroalimentarios debe incluir los porcentajes de ciertos nutrientes, como grasa, grasa saturadas, carbohidratos, azúcares o proteínas, aplicaciones como las descritas en esta tesis doctoral toman una mayor relevancia dada su capacidad de control eficiente, objetivo y económico.

Durante la realización de esta tesis doctoral se han producido importantes avances en instrumentación NIRS. Concretamente han aparecido una nueva versión del instrumento MEMS evaluado (MicroPhazirTM). Este equipo ya incluye algunas mejoras de las propuestas en esta tesis doctoral, tales como la incorporación de referencia interna y una ventana de protección en la zona de muestreo para proteger el detector y la fuente de radiación. Asimismo, en relación al tamaño de la zona de muestreo, recientemente ha salido al mercado un equipo basado también en tecnología MEMS denominado TruProcessTM. Este espectrofotómetro trabaja sin la necesidad de estar en contacto directo con la muestra. Su área de muestreo puede llegar a los 5 cm, según la distancia entre la muestra y el detector (ver sección 3.3.2). Sería recomendable el evaluar estos equipos y otros como los instrumentos MicroNIRTM, también descritos en la sección 3.3.2 que se basan en tecnología LVF. Los estudios relativos a la transferencia de bases de datos con información espectral y de referencia serán de utilidad para futuras investigaciones a realizar con estos nuevos diseños instrumentales.

La integración de estos sensores con sistemas modernos de comunicación e información, así como otras tecnologías o técnicas analíticas puede mejorar la implantación de esta tecnología como sistema de control de calidad en tiempo real. En la actualidad, dispositivos electrónicos de identificación animal, como

crotales o chips, basados en identificación por radiofrecuencia (RFID, *Radio Frequency Identification*) son un método simple y automático que permite una buena organización del ganado en las explotaciones. Este método es obligatorio para especies como ovino y caprino, y en un futuro para otras como el porcino. Esta tecnología ayuda a la trazabilidad de los animales desde su nacimiento hasta que llegan al matadero. La integración de este tipo de sensores identificativos, junto con sensores de control de calidad, como la tecnología NIRS, podría mejorar la trazabilidad y autenticación de los productos de forma individual, favoreciendo el diseño de sistemas de apoyo a la toma de decisiones en tiempo real, tanto en el campo como en la industria del cerdo ibérico.

La implantación de la tecnología NIRS no sólo requiere de la evaluación de un determinado equipo para demostrar su potencial o del diseño de estrategias de mantenimiento, supervisión y transferencia de modelos predictivos multivariantes, sino asimismo, el profundizar en las bases teóricas de la interacción entre la radiación NIR y los tejidos biológicos de interés, así como la incorporación de conocimientos de programación e integración de sensores para el diseño de plataformas de apoyo a la toma de decisiones que permitan al usuario final disponer, de una forma sencilla y remota, de los datos analizados. Esto permite el utilizar todo el potencial de la tecnología NIRS de cara a su transferencia a la industria de transformación cárnica, así como abrir nuevas líneas de investigación para generar mayor conocimiento científico y técnico.

Las aplicaciones basadas en el análisis del tejido adiposo intacto han demostrado que la capacidad predictiva de los modelos cuantitativos y cualitativos se ve comprometida frente a otros modos de análisis como grasa fundida. Parte de esta pérdida de predicción y exactitud puede deberse a la menor capacidad de los instrumentos utilizados (fibra óptica o equipos portátiles) en relación a los monocromadores de altas prestaciones científico-técnicas utilizados en laboratorio. Pero, asimismo, otra razón importante puede ser la complejidad de la matriz a analizar.

Los trabajos en esta tesis doctoral referentes a la caracterización óptica del tejido cutáneo y subcutáneo porcino, así como la simulación de la propagación de la luz en estos tejidos biológicos, sólo constituyen el inicio de una línea de investigación más amplia. Entender el paso óptico y la penetración de la radiación NIRS en tejidos biológicos es fundamental para avanzar significativamente en el análisis no destructivo y no invasivo NIRS de productos agroalimentarios intactos

Los resultados presentados en este documento muestran el potencial de nuevos equipos DIS, combinados con detectores para medir la transmitancia no dispersa de las muestras, para caracterizar ópticamente tejidos biológicos sin la necesidad de asumir parámetros, como el factor de anisotropía, que pueden tener un efecto importante sobre la estima de, por ejemplo, el

coeficiente de dispersión. Los ensayos que componen parte de esta tesis doctoral han caracterizado ópticamente, por primera vez en la literatura científica, tejido cutáneo y subcutáneo porcino para un rango bastante amplio de la región del infrarrojo cercano (1.150-2.250 nm). Estos datos tienen una alta relevancia dado que podrían servir de base para el desarrollo de otros estudios relacionados con la propagación de la radiación NIR en el tejido porcino.

Un aspecto clave para poder obtener las propiedades ópticas de un tejido biológico de una forma adecuada y precisa recae en la obtención de unos valores experimentales de transmitancia total (T_t), reflectancia total (R_t) y transmitancia no dispersa (T_c) adecuados. Para ello, es necesario determinar el espesor óptimo que se debe analizar en una esfera integradora de cada capa para obtener al menos valores de R_t entre 10 % y 20 %, aunque lo óptimo es que el espesor proporcione valores de R_t y T_t de un 50 % cada uno. En este documento, se muestra el efecto que tiene el espesor en las medidas y en la posterior simulación de las propiedades óptimas

La relevancia de estos estudios no sólo radica en el inicio de una nueva línea de investigación que permita, en un futuro, optimizar la adquisición de datos espectrales en productos intactos, el desarrollo de modelos con mayores capacidades predictivas o el diseño de nuevos equipos que permitan penetrar a las capas de interés, sino asimismo son importantes para otros campos científicos como la biomedicina. La caracterización óptica de tejidos que frecuentemente son usados como modelos de la piel humana es muy relevante para aplicaciones en otros campos científicos. Asimismo, los ensayos y resultados estimados han mostrado el potencial de nuevos equipos DIS para medidas experimentales de reflectancia total, transmitancia total y transmisión no dispersa también son de actualidad científica.

Cualquier aplicación real o transferencia industrial requiere de la puesta a punto de instrumentos y modelos robustos que, hoy en día, son actividades de I+D+i para la industria, aunque tesis doctorales como ésta faciliten dicha tarea. Los resultados obtenidos en esta tesis doctoral hacen que la implantación de un sistema de control no destructivo e *in situ* de productos y procesos en la industria del cerdo ibérico usando sensores espectrales de infrarrojo cercano sea factible y deseable.

Los periodos de recesión económica que se viven en los últimos tiempos han tenido su impacto negativo en estos aspectos de I+D+i en la industria agroalimentaria española, especialmente para la incorporación de nuevas tecnologías. Las empresas han reducido su apoyo financiero para el desarrollo de proyectos de innovación. Sin embargo, este panorama se ha visto compensado por la colaboración entre empresas para desarrollar proyectos de innovación/investigación y también con centros públicos de investigación o universidades. La industria cárnica española, y más concretamente la industria

del cerdo ibérico, tiene a su disposición, a través de esta tesis doctoral, información contrastada científicamente para la toma de decisiones en cuenta a las ventajas de incorporar la tecnología NIRS en su control de productos y procesos, lo que sin duda facilitaría el cumplimiento normativo de control de calidad, trazabilidad y su posicionamiento diferencial en el mercado.

Un trabajo conjunto de todos los agentes involucrados en el sector del cerdo ibérico a nivel de procesamiento, control y certificación (existen 16 empresas certificadoras autorizadas de productos derivados de cerdo ibérico bajo Norma de Calidad, 53 mataderos en España están dedicados directamente al sector ibérico y más de 300 empresas cárnicas están registradas en IBERAICE – Asociación Española de Industrias Cárnicas del Cerdo Ibérico, así como laboratorios externos: centros de investigación, centros tecnológicos o ASICI) junto con el apoyo y reconocimiento de la Administración y las organizaciones de consumidores sería fundamental para transferir este trabajo y avanzar en aquellos aspectos críticos, no evaluados aún, que permitieran afianzar la confianza del consumidor en el sector y mejorar la actual tendencia decreciente del mercado.

Hay que tener en cuenta que cualquier avance en afianzar el mercado de los productos del cerdo ibérico tiene su repercusión directa en la conservación y sostenibilidad de la dehesa y de los ecosistemas territoriales vinculados. Esta tesis doctoral, por tanto, no sólo aporta nuevos conocimientos científicos relacionados con la caracterización óptica de tejidos biológicos, interesantes para distintas áreas de conocimiento, ni pone a punto una metodología, protocolo o genera las bases científico-técnicas para una exitosa implantación y transferencia de equipos MEMS-NIRS portátiles en la industria cárnica, sino que incide en multitud de aspectos de carácter multidisciplinar imprescindibles para la correcta y completa integración de la tecnología NIRS en la industria de transformación del cerdo ibérico, aportando un alto valor intangible a la producción, control de calidad y diferenciación de productos derivados del cerdo ibérico.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONS



7. Conclusiones

Las principales conclusiones que se desprenden de la investigación realizada, metodologías propuestas y resultados obtenidos de esta tesis doctoral son:

1. La metodología propuesta para controlar, supervisar, actualizar y recalibrar modelos cuantitativos NIRS en productos derivados del cerdo ibérico ha mostrado la importancia de seleccionar un reducido colectivo de muestras de recalibración para la detección e interpretación fiable de muestras aparentemente no representadas en el colectivo de calibración. El uso y entendimiento de estadísticos basados en distancias espectrales, para asegurar la precisión y exactitud de los valores NIRS predichos, es crítico para la minimización de costes analíticos asociados al proceso de recalibración. *[Esta conclusión ha sido obtenida del artículo “Monitoring NIRS calibrations for use in routine meat analysis as part of iberian pig-breeding programs (Food Chemistry, 2012)” y de los trabajos “Control y recalibración de modelos NIRS para la predicción de ácidos grasos en muestras de grasa subcutánea fundida de cerdo ibérico” y “Control y recalibración de modelos NIRS para la predicción de ácidos grasos en muestras de tejido adiposo subcutáneo intacto de cerdo ibérico”].*
2. El protocolo diseñado para el correcto análisis espectral de productos cárnicos con equipos MEMS-NIRS proporciona las pautas necesarias para una correcta utilización de estos equipos y la adquisición de espectros representativos y con alta calidad espectral. Realizar semanalmente el test de validación de funcionamiento, junto con un control adicional del valor de reflectancia del material de referencia, es recomendable para detectar posibles problemas o desvíos en las medidas espectrales. *[Esta conclusión parte de los resultados y conclusión del apartado 5.2 “Optimización de parámetros instrumentales y protocolo para el análisis espectral de productos cárnicos con equipos MEMS-NIRS portátiles”].*
3. Para asegurar una alta repetibilidad de los datos espectroscópicos NIRS de canales analizadas con un equipo MEMS-NIRS se recomienda tomar al menos 4 espectros distribuidos a lo largo del tejido adiposo subcutáneo. El análisis se debe realizar a unos 10 cm del área de

inserción del rabo en la canal. Se debe evitar la realización de medidas en zonas con presencia de sangre, superficie no plana o con fisuras en el tejido. Un valor superior de RMS a 43.000 $\mu\log(1/R)$ es indicativo de baja repetibilidad espectral para este tipo de análisis *in situ* en la línea de faenado. [Esta conclusión se desprende del artículo “*In-situ iberian pig carcass classification using a micro-electro-mechanical system (MEMS)-based near infrared (NIR) spectrometer*” (Meat Science, 2012)].

4. Los algoritmos cualitativos evaluados para la clasificación de canales de cerdo ibérico, en función del régimen alimenticio del animal durante los dos meses previos al sacrificio, mediante el análisis *in situ* de canales en la línea de faenado con equipos MEMS-NIRS han demostrado su elevada capacidad para discriminar entre las diversas categorías reconocidas por la Norma de Calidad [Esta conclusión se extrae del artículo “*In-situ iberian pig carcass classification using a micro-electro-mechanical system (MEMS)-based near infrared (NIR) spectrometer*” (Meat Science, 2012) y del estudio “*Evaluación de distintos algoritmos cualitativos para la clasificación in situ de canales de cerdos ibéricos en función de su régimen alimenticio*”].
5. Los modelos cuantitativos obtenidos para la determinación de ácidos grasos mayoritarios en canales de cerdo ibérico analizadas *in situ* en la línea de faenado con equipos MEMS-NIRS presentan una adecuada precisión teniendo en cuenta las ventajas prácticas de este tipo de análisis frente a otras formas de presentación o instrumentación. El error total del análisis individual de canales de cerdo ibérico con equipos MEMS-NIRS en la línea de faenado frente al error total del método de cromatografía de gases para la media de lotes de animales para cada ácido graso evaluado son similares. [Esta conclusión está extraída del artículo “*Prediction of fatty acid content in pig adipose tissues by near infrared spectroscopy: at-line versus in-situ analysis*” (Meat Science, enviado)].
6. La utilización de funciones de interpolación junto con un adecuado algoritmo de estandarización, como *Spectral Difference by Wavelengths*, ha mostrado ser muy útil para la transferencia de bases de datos espectrales de carne picada de cerdo ibérico entre monocromadores de altas prestaciones científico-técnicas y equipos portátiles con un diseño

óptico distinto. La estrategia de clonación inversa, es decir, el equipo al que se quiere transmitir las bases de datos espectrales como máster y el equipo en el que se han analizado todas las muestras como satélite, permite transferir con éxito modelos cuantitativos para estimar la composición analítica (grasa, humedad y proteína) de carne picada de cerdo con una capacidad predictiva similar a los originales. Así, se evita tener que aplicar una matriz de estandarización a cada nuevo espectro analizado en el equipo portátil. [Conclusión extraída del artículo “*Handheld NIRS analysis for routine meat quality control: database transfer from at-line instruments*” (Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, 2012)].

7. La utilización de equipos portátiles MEMS-NIRS permite el control de calidad *in situ* de productos y procesos en la industria de transformación del cerdo ibérico de una forma sostenible, eficiente, rápida, competitiva, segura, de bajo coste, objetiva, fiable e individual. Esto permite la posibilidad de incrementar los actuales controles de calidad que se realizan de manera rutinaria de forma que se pueda garantizar la calidad y homogeneidad de los productos derivados. [Esta conclusión se desprende de los artículos “*In-situ iberian pig carcass classification using a micro-electro-mechanical system (MEMS)-based near infrared (NIR) spectrometer*” (Meat Science, 2012), “*Prediction of fatty acid content in pig adipose tissues by near infrared spectroscopy: at-line versus in-situ analysis*” (Meat Science, enviado) y “*Handheld NIRS analysis for routine meat quality control: database transfer from at-line instruments*” (Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, 2012)].
8. Aspectos como el rango de longitudes de onda, intervalo entre longitudes de onda y el tamaño de la ventana de muestreo son críticos en la capacidad predictiva de equipos MEMS-NIRS para el análisis *in situ* de canales de cerdo ibérico. Los resultados obtenidos pueden servir a fabricantes de instrumentos NIRS para el diseño y adaptación de dichos espectrofotómetros a este tipo de aplicaciones *in situ*. [Esta conclusión se desprende de los artículos “*In-situ iberian pig carcass classification using a micro-electro-mechanical system (MEMS)-based near infrared (NIR) spectrometer*” (Meat Science, 2012), “*Prediction of fatty acid content in pig adipose tissues by near infrared spectroscopy: at-line versus in-situ analysis*” (Meat Science, enviado) y “*Handheld NIRS*”

analysis for routine meat quality control: database transfer from at-line instruments” (Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, 2012)].

9. Un sistema de dobles esferas integradoras combinado con un sistema de medida de la transmitancia no dispersa permite caracterizar ópticamente, con alta precisión, tejido cutáneo (epidermis y dermis) y subcutáneo (adiposo) porcino. De esta forma, ha sido posible determinar el factor anisotrópico de estos tejidos y mostrar su influencia en la determinación del coeficiente de dispersión. *[Esta conclusión se desprende de los artículos “Double integrating spheres measurements for estimating optical properties of pig subcutaneous adipose tissue” (Food and Bioprocess Technology, enviado) y “Optical properties of pig skin epidermis and dermis estimated with double integrating spheres measurements” (Innovative Food Science and Emerging Technologies, enviado)].*
10. La caracterización óptica de tejido cutáneo y subcutáneo porcino puede tener una importante relevancia para diseñar y adaptar instrumentos NIRS y optimizar el análisis de datos espectrales con el objetivo de obtener información útil de medidas no destructivas de tejido adiposo y cutáneo. *[Conclusión del estudio “Characterization of diffuse reflectance near-infrared spectroscopy for non-invasive pig skin measurement” (Food and Bioprocess Technology, enviado)].*
11. Los resultados de los modelos de simulación Monte Carlo y las pruebas experimentales con SRS realizadas muestran que la mayoría de la información espectral obtenida de medidas NIRS realizadas a través de la piel de cerdo proceden de la dermis, siendo muy reducido el número de fotones detectados procedentes del tejido subcutáneo adiposo. *[Esta conclusión radica en los resultados del estudio “Characterization of diffuse reflectance near-infrared spectroscopy for non-invasive pig skin measurement” (Food and Bioprocess Technology, enviado)].*
12. La integración de sensores espectrales portátiles que trabajan en el infrarrojo cercano junto con otras tecnologías de la información y de la comunicación, así como con rutinas de programación diseñadas específicamente para el tratamiento de datos espectrales, permite el desarrollo de plataformas de apoyo a la toma de decisiones para el

control de calidad *in situ* y no destructivo en la industria de transformación cárnica. Esto proporciona a la industria y a la Administración una herramienta objetiva, fiable, rápida, de bajo coste y vanguardista para garantizar la calidad y homogeneidad de los productos derivados, proporcionando un sello de autenticación que sin duda será muy valorado por los consumidores. *[Esta conclusión ha sido obtenida de la sección “Diseño de plataformas de apoyo a la toma de decisión en la industrial del cerdo ibérico basadas en la tecnología NIRS”].*

7. Conclusions

Main research findings, proposed methodologies and obtained results from this PhD thesis are:

1. The proposed methodology for monitoring NIRS quantitative models in iberian pork meat products has revealed the relevance of selecting a small recalibration sample set in order to detect and interpretate apparently not represented samples in the calibration set. The use and understanding of statistics based on spectral distances, to ensure the accuracy and precision of NIRS predicted values, are critical to minimize analytical costs associated to the recalibration process. *[This conclusion has been obtained from the paper "Monitoring NIRS calibrations for use in routine meat analysis as part of iberian pig-breeding programs (Food Chemistry, 2012)" and from the studies "Control y recalibración de modelos NIRS para la predicción de ácidos grasos en muestras de grasa subcutánea fundida de cerdo ibérico" and "Control y recalibración de modelos NIRS para la predicción de ácidos grasos en muestras de tejido adiposo subcutáneo intacto de cerdo ibérico"]*.
2. The protocol designed for the correct spectral analysis of meat products with MEMS-NIRS devices provides the necessary guidelines for a proper use of these spectrometers and the acquisition of representative and high quality spectra. A weekly control of the device with the "performance qualification" test, together with an additional control of the reflectance value of the reference material, are recommended for detection of possible problems or deviations in the spectral measurements. *[This conclusion comes from the results of section 5.2 "Optimización de parámetros instrumentales y protocolo para el análisis espectral de productos cárnicos con equipos MEMS-NIRS portátiles"]*.
3. To ensure a high NIRS spectral repeatability of carcasses analyzed by MEMS-NIRS instruments is recommended to take at least four scans along the sample area of the subcutaneous adipose tissue. The analysis should be performed at 10 cm from the insertion area of the tail in the carcass. Measurements on blood areas, uneven surfaces or with fissures should be avoided. A RMS value larger than 43,000 $\mu\log(1/R)$ is indicative of a low spectral repetability for this *in-situ* carcass analysis in the process line. *[This conclusion follows from the article "In-situ iberian pig carcass classification using a micro-electro-mechanical system (MEMS)-based near infrared (NIR) spectrometer" (Meat Science, 2012)]*.

4. *In-situ* analysis of iberian pig carcasses with MEMS-NIRS devices is able to discriminate among animals fed under different feeding regimes in the last two months previous to be slaughtered, as the categories recognized by the Quality Norm. [This conclusion is drawn from the paper "*In-situ iberian pig carcass classification using a micro-electro-mechanical system (MEMS)-based near infrared (NIR) spectrometer*" (Meat Science, 2012) and the study "*Evaluación de distintos algoritmos cualitativos para la clasificación in situ de canales de cerdos ibéricos en función de su régimen alimenticio*"].
5. Quantitative models obtained for the determination of major fatty acids in iberian pig carcasses analyzed *in-situ* in the process line with MEMS-NIRS equipments have suitable precision, considering the practical advantages of this type of analysis, in comparison to other analysis modes and instrumentations. The total error of the individual MEMS-NIRS analysis of iberian pig carcasses is comparable with the total error of the gas chromatography method for the evaluation of the average sample of a batch of animals. [This conclusion is drawn from the paper "*Prediction of fatty acid content in pig adipose tissues by near infrared spectroscopy: at-line versus in-situ analysis*" (Meat Science, submitted)].
6. The use of interpolation functions with an adequate standardization algorithm, as Spectral Difference by Wavelengths, has proven to be very useful for transferring spectral databases of ground iberian pork meat from high-performance monochromators to portable spectrometers with a different optical design. The inverse cloning strategy, it means, the master is the portable instrument while the host is the monochromator, enables a successful standardization of quantitative models to estimate chemical composition (fat, moisture and protein) of ground pork meat with a predictive capability similar to the original ones. So, the application of the standardized matrix can be avoided each time that a new spectrum is analyzed on the handheld device. [Conclusion drawn from the paper "*Handheld NIRS analysis for routine meat quality control: database transfer from at-line instruments*" (Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, 2012)].
7. The use of portable MEMS-NIRS enables *in-situ* quality control of products and processes in the iberian pig meat industry in a sustainable, efficient, fast, competitive, safety, low-cost, objective, reliable and individual way. This represents enhancing existing controls routinely performed in the industry for quality and homogeneity assurance of the derived products. [This conclusion follows from the papers "*In-situ iberian pig carcass classification using a micro-electro-mechanical system (MEMS)-based near infrared (NIR) spectrometer*" (Meat Science, 2012),

"Prediction of fatty acid content in pig adipose tissues by near infrared spectroscopy: at-line versus in-situ analysis" (Meat Science, submitted) and "Handheld meat NIRS analysis for routine quality control: database transfer from at-line instruments" (Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, 2012)].

8. Aspects such as the wavelength range, interval step and sampling area size have relevant influence on the predictive ability of MEMS-NIRS spectrometers for *in-situ* analysis of iberian pig carcasses. The obtained results can serve to NIRS instrument manufacturers for designing and adapting these spectrophotometers for this type of *in-situ* application. *[This conclusion comes from the papers "In-situ iberian pig carcass classification using a micro-electro-mechanical system (MEMS)-based near infrared (NIR) spectrometer" (Meat Science, 2012), "Prediction of fatty acid content in pig adipose tissues by near infrared spectroscopy: at-line versus in-situ analysis" (Meat Science, submitted) and "Handheld NIRS analysis for routine meat quality control: database transfer from at-line instruments" (Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, 2012)].*
9. A double integrating sphere system combined with an unscattered transmittance measurement system enables the optical characterization, with high accuracy, of skin (epidermis and dermis) and subcutaneous (adipose) pig tissues. Thus, it has been possible to determine the anisotropy factor spectra of these tissues and show its influence on the determination of the scattering coefficient spectra. *[This conclusion follows from the papers "Double integrating spheres measurements for estimating optical properties of pig subcutaneous adipose tissue" (Food and Bioprocess Technology, submitted) and "Optical properties of pig skin epidermis and dermis estimated with double integrating spheres measurements" (Innovative Food Science and Emerging Technologies, submitted)].*
10. The optical characterization of skin and subcutaneous pig tissues can have significant relevance in the design and adaptation of NIRS instruments and in the optimization of spectral data treatment in order to obtain useful information from non-destructive measurements of intact adipose tissue and skin. *[Conclusion of the study "Characterization of diffuse reflectance near-infrared spectroscopy for non-invasive pig skin measurement" (Food and Bioprocess Technology, submitted)].*
11. The Monte Carlo simulation results and the experimental SRS measurements performed showed that most of the detected light collected from skin NIRS measurements comes from the dermis layer, with only a small number of detected photons from the subcutaneous adipose tissue.

[This conclusion stems from the results of the study "Characterization of diffuse reflectance near-infrared spectroscopy for non-invasive pig skin measurement" (Food and Bioprocess Technology, submitted)].

12. The integration of portable spectral sensors working in the near infrared region together with other information and communication technologies, as well as programming routine designed specifically for spectral data treatment, enable the development of making-decision support systems for the *in-situ* and non-destructive quality control in the iberian meat industry. This provides the industry and the State Administration with an objective, reliable, fast, cost-efficient, innovative tool to ensure quality and homogeneity of the derived products, offering a quality mark to the consumers. *[This conclusion has been obtained from the section "Diseño de plataformas de apoyo a la toma de decisión en la industrial del cerdo ibérico basadas en la tecnología NIRS"]*.

BIBLIOGRAFÍA



8. Bibliografía

Abdo, A., y Sahin, M. (2007). NIR light penetration depth in the rat peripheral nerve and brain cortex. *Proceedings of the 29th Annual International Conference of the IEEE EMBS*, France.

Adame-Siles, J.A. (2012). Tecnología móvil para la adquisición y gestión de datos de campo en tiempo real. Trabajo Fin de Máster. Universidad de Córdoba.

AEA. (2011). Competencia y cadena de valor en la producción y distribución de productos ibéricos en Andalucía. Agencia de Defensa de la Competencia de Andalucía. Analistas Económicos de Andalucía. www.economiaandaluza.es/sites/default/files/Informe%20Productos%20Ib%C3%A9ricos.pdf. Accedido el 12/01/2013.

Aernouts, B., Do Trong, N.N., Watté, R., Bruggeman, W., Tsuta, M., Verboven, P., Nicölai, B., y Saeys, W. (2011). Food quality control by combining light propagation models with multiple VIS/NIR reflectance measurements. *NIR News*, **22**(2), 14-16.

AESAN. (2012). Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. Establecimientos autorizados según normas UE. www.aesan.msc.es/rgsa/formulario_ue_js.jsp. Accedido el 19/11/2012.

Alcalá, M., Blanco, M., Menezes, J.C., Felizardo, P.M., Garrido, A., Pérez, D., Zamora, E., Pasquini, C., y Romañach, R. (2012). Food and agriculture applications: a tribute to Prof. Dr. J. S. Shenk. En *Near-Infrared Spectroscopy in laboratory and process analysis*. Encyclopedia of Analytical Chemistry. Online ISBN: 9780470027318. DOI: 10.1002/9780470027318.a9361

Alimarket. (2002). Cerdo Ibérico ¿hasta cuándo la edad de oro? Monográfico. *Alimarket*, **155**, 227-239.

Alonso, R., Rodríguez-Estévez, V., Domínguez-Vidal, A., Ayora-Cañada, M.J., Arce, L., y Valcárcel, M. (2008). Ion mobility spectrometry of volatile compounds from iberian pig fat for fast feeding regime authentication. *Talanta*, **76**, 591-596.

Anderssen, R.S., Osborne, B.G., y Wesley, I.J. (2003). The application of localization to near infrared calibration and prediction through partial least squares regression. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, **11**, 39-48.

Andrés, A.I., Vaca, R., Ventanas, J., Thovar, V., y Ruiz, J. (2004). Sensory characteristics of iberian ham: Influence of salt content and processing conditions. *Meat Science*, **68**, 45-51.

Andrew, A., y Fearn, T. (2004). Transfer by orthogonal projection: making near-infrared calibrations robust to between-instrument variation. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, **72**, 51-56.

Antequera, T., Muriel, E., Rodríguez, P.G., Cernadas, E., y Ruiz, J. (2003). Magnetic resonance imaging as a predictive tool for sensory characteristics and intramuscular fat content of dry-cured loin. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **83**, 268-274.

Antequera, T., Caro, A., Rodríguez, P.G., y Pérez, T. (2007). Monitoring the ripening process of iberian ham by computer vision on magnetic resonance imaging. *Meat Science*, **76**, 561-567.

AOAC. (1984). Official method 28.023: iodine value of edible oils and fats according to Wijs. Official methods of analysis. AOAC International, Gaithersburg, Maryland, USA.

AOAC. (1990). Official method 920.157: melting point of fats and fatty acids capillary tube method. Official methods of analysis. AOAC International, Gaithersburg, Maryland, USA.

AOAC. (1999). Official method 962.22: methyl esters of fatty acids in oils and fats. Official methods of analysis. AOAC International, Gaithersburg, Maryland, USA.

Arce, L., Domínguez-Vidal, A., Rodríguez-Estévez, V., López-Vidal, S., Ayora-Cañada, M.J., y 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.

Arimoto, H., Egawa, H., y Yamada, Y. (2005). Depth profile of diffuse reflectance near-infrared spectroscopy for measurement of water content in skin. *Skin Research and Technology*, **11**, 27-35.

Armenta, S., Alcalá, M., y Blanco, M. (2011). A review of recent, unconventional applications of ion mobility spectrometry (IMS). *Analytica Chimica Acta*, **703**, 114-123.

ASICI. (2012a). Datos Cerdos RIBER 2011. www.iberico.com/contenidos/documentos/CERDOS%20INSPECCIONADOS%202011.pdf. Accedido el 12/11/2012.

ASICI. (2012b). Consumo de derivados del cerdo ibérico en hogares en el año 2011. www.iberico.com/contenidos/documentos/CONSUMO%20HOGARES%202011.pdf. Accedido el 25/10/2012.

ASICI. (2012c). Datos Cerdos RIBER 2º trimestre 2012. www.iberico.com/contenidos/documentos/CERDOS%20CERTIFICADOS%20Censos%20T2%202012.pdf. Accedido el 15/11/2012.

ASTM E1655-05. (2012). Standard Practices for Infrared Multivariate Quantitative Analysis. Annual Book of ASTM Standard.

Ávila, M.M., Durán, M.L., Antequera, T., Palacios, R., y Luquero, M. (2007). 3D reconstruction on MRI to analyze marbling and fat level in iberian loin. *Pattern Recognition and Images Analysis*, **4477**, 145-152.

Barbin, D.F., ElMasry, G., Sun D.W., y Allen, P. (2012). Predicting quality and sensory attributes of pork using near-infrared hyperspectral imaging. *Analytica Chimica Acta*, **719**, 30-42.

Barnes, R.J., Dhanoa, M.S., y Lister, S.J. (1989). Standard normal variate transformation and de-trending of near infrared diffuse reflectance spectra. *Applied Spectroscopy*, **43** (5), 772-777.

Bashkatov, A.N., Genina, E.A., Kochubey, V.I., y Tuchin V.V. (2005). Optical properties of the subcutaneous adipose tissue in the spectral range 400-2500 nm- *Geometrical and Applied Optics*, **99**(5), 868-875

Bashkatov, A.N., Genina, E.A., y Tuchin, V.V. (2011). Optical properties of skin, subcutaneous and muscle tissues: a review. *Journal of Innovative Optical Health Sciences*, **4** (1), 9-38.

Bertran, E., Blanco, M., MasPOCH, S., Ortiz, M.C., Sánchez, M.S., y Sarabia, L.A. (1999). Handling intrinsic non-linearity in near-infrared reflectance spectroscopy. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, **49**, 215-224.

Bertrand, D. (2000). Prétraitements des données spectrales. En D. Bertrand y E. Dufour (Eds.). *La spectroscopie infrarouge et ses applications analytiques*, (p. 351-367) TEC&DOC Editions, Francia.

BESANA. (2012). IBERAICE presenta las propuestas de la industria para la modificación de la norma de calidad del ibérico. www.besana.es/es/web/201211/iberaice-presenta-propuestas-industria-para-modificacion-norma-calidad-iberico. Accedido el 12/01/2013.

Bockish, M. (1998). Composition, structure, physical data and chemical reactions of fats and oils, their derivatives and their associates. En *Fats and Oils Handbook*, (p. 53-120) AOCS Press, Champaign, Illinois, USA.

BOE. (1988). Orden de 7 de noviembre de 1988 por la que se homologa el contrato-tipo de compraventa de cerdos ibéricos y sus cruces, con destino a su sacrificio y elaboración, para la campaña 1988-89. BOE nº 268.

BOE. (2004). Orden PRE/3844/2004. Orden, de 18 de noviembre, por la que se establecen los métodos oficiales de toma de muestras en canales de cerdos ibéricos y el método de análisis para la determinación de la composición de ácidos grasos de los lípidos totales del tejido adiposo subcutáneo de cerdos ibéricos. BOE nº 283.

BOE. (2007a). Real Decreto 1469/2007, de 2 de noviembre, por el que se aprueba la norma de calidad para la carne, el jamón, la paleta y la caña de lomo ibéricos. BOE nº 264.

BOE. (2007b). Orden APA/3653/2007. Orden, de 13 de diciembre, por la que se publican los valores de ácidos grasos aplicables a las designaciones de alimentación «bellota» y «recebo», para la campaña 2007-2008. BOE nº 300.

BOE. (2010a). Ley 7/2010 para la Dehesa. BOE nº 193.

BOE. (2010b). Orden ARM/2139/2010, de 16 de julio, por la que se extiende el Acuerdo de la Asociación Interprofesional del Cerdo Ibérico, al conjunto del sector, y se fija la aportación económica obligatoria, para realizar actividades de promoción de los productos del cerdo ibérico, mejorar la información y conocimiento sobre las producciones y los mercados, y realizar programas de investigación, desarrollo, innovación tecnológica y estudios, para las campañas 2010-2011, 2011-2012 y 2012-2013. BOE nº 188.

BOJA. (2011). Ley 2/2011, de 25 de marzo, de la Calidad Agroalimentaria y Pesquera de Andalucía. BOE nº 99.

Bonneau, M., y Lebret, B. (2010). Production systems and influence on eating quality of pork. *Meat Science*, **84**, 293-300.

Borggaard, C. (2001). Neural networks in near infrared spectroscopy. En P. Williams y K. Norris (Eds.), *Near-infrared technology in the agricultural and food industries* (p. 101-107). Minnesota, USA.

Bouveresse, E., Massart, D.L., y Dardenne, P. (1994). Calibration transfer across near infrared spectrometric instrument using Shenk's algorithm: effects of the different standardization samples. *Analytica Chimica Acta*, **297**, 405-416.

Bouveresse, E., y Massart, D.L. (1996). Standardisation of near-infrared spectrometric instruments: a review. *Vibrational Spectroscopy*, **11**, 3-15.

Broad, N., Graham, P., Hardy, A., Holand, S., Hughes, S., Lee, D., Prebble, K., Salton, N., y Warren, P. (2002). Guidelines for the development and validation of near-infrared spectroscopic methods in the pharmaceutical industry. En J.M. Chalmers y P. R. Griffiths (Eds.) *Handbook of Vibrational Spectroscopy*. John Wiley & Sons Ltd, Chichester.

Carraspiso, A.I., Ventanas, J., Jurado, A., y García, C. (2001). An electronic nose to classify iberian pig fats with different fatty acid composition. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **78** (4), 415-418.

Carraspiso, A.I., Jurado, A., y García, C. (2003a). Effect of crossbreeding and rearing system on iberian ham volatile compounds. *Food Science and Technology International*, **9** (6), 421-426.

Carraspiso, A.I., Bonilla F., y García, C. (2003b). Effect of crossbreeding and rearing system on sensory characteristics of iberian ham. *Meat Science*, **65**, 623-629.

Carraspiso, A.I., Jurado, A., Martín, L., y García, C. (2007). The duration of the outdoor rearing period of pigs influences iberian ham characteristics. *Irish Journal of Agricultural and Food Research*, **46**, 105-115.

Casillas, M. (1994). Metodologías de caracterización de grasa de cerdo Ibérico para el control de calidad de sus productos. Tesis doctoral. Universidad de Córdoba.

Cava, R., Ruiz, J., López-Bote, C., Martín, L., García, C., Ventanas, J., y Antequera, T. (1997). Influence of finishing diet on fatty acid profiles of intramuscular lipids, triglycerides and phospholipids in muscles of the iberian pig. *Meat Science*, **45** (2), 263-270.

Cava, R., Ventanas, J., Ruiz, J., Andrés A.I., y Antequera, T. (2000). Sensory characteristics of iberian ham: Influence of rearing system and muscle location. *Food Science Technology International*, **6**, 235-242.

Cernadas, E., Duran, M.L., y Antequera, T. (2002). Recognizing marbling in dry-cured iberian ham by multiscale analysis. *Pattern Recognition Letter*, **23**, 1211-1321.

Cernadas, E., Carrión, P., Rodríguez, P.G., Muriel, E., y Antequera, T. (2005). Analyzing magnetic resonance images of iberian pork loin to predict its sensorial characteristics. *Computer Vision and Image Understanding*, **98**, 345-361.

Chao, K., Kim, M.S., y Chan, D.E. (2011). Control interface and tracking control system for automated poultry inspection. *Computer Standards & Interfaces*, doi:10.1016/j.csi.2011.03.006.

Cheng, S., Shen, H.Y., Zhang, G., Huang, C.H., y Huang, X.J. (2002). Measurement of the refractive index of biological tissue at four laser wavelengths. *Proceedings of SPIE*, **4916**, 172-176.

Cheong, W., Prahl, S., y Welch, A. (1990). A review of the optical properties of biological tissues. *IEEE Journal of Quantum Electronics*, **26** (12), 2166-2185.

Cian, A., Milner, T., Telenkov, S., Schuster, K., Stockton, K., Stolarski, D., Condit, C., y Rockwell, B. (2004). Porcine skin thermal response to near-IR lasers using a fast infrared camera. En S.L. Jacques y P.W. Roach (Eds.). *Laser Interaction with tissue and cells*, (p. 313-324). SPIE Bellingham WA.

Clinuvel Pharmaceuticals. (2010). www.clinuvel.com/en/skin-science/skin-sun/light-and-skin-interaction. Accedido el 12/01/2013.

Crocombe, R. (2004). MEMS technology moves process spectroscopy into a new dimension. *Spectroscopy Europe*, **16**, 16-19.

Cubeddu, R., D'Andrea, C., Pifferi, A., Taroni, P., Torricelli, A., Valentini, G., Dover, C., Johnson, D., Ruiz-Altisent, M., y Valero, C. (2001). Nondestructive quantification of chemical and physical properties of fruits by time-resolved reflectance spectroscopy in the wavelength range 650-1000 nm. *Applied Optics*, **40** (4), 538-43.

Dahm, D.J., y Dahm, K.D. (2001). The physics of near infrared scattering. En P. Williams y K. Norris (Eds.) *Near Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries* (2º Edición), (p. 1-18). America Association of Cereal Chemists, Inc. St Paul, Minnesota, USA.

Dami, M., De Vidi, R., Aroldi, G., Belli, F., Chicarella, L., Piegari, A., Sytakhova, A., Bulir, F., Lemarquis, F., Lequime, M., Abel Tiberine, L., y Harnisch, B. (2010). Ultra compact spectrometer using linear variable filters. *International Conference on Space Optics*, Greece.

Dardenne, P., Biston, R., y Sinnaeve, G. (1992). Calibration transferability across NIR instruments. En K.I. Hildrum, T. Isaksson, T. Naes, y A. Tandberg (Eds.), *Near Infrared Spectroscopy: Bridging the gap between data analysis and NIR applications*. West Sussex, U.K.

Dardenne, P. (2002). Calibration transfer in near infrared spectroscopy, *NIRS News*, **13** (4), 3-7.

Davies, A.M.C., Britcher, H.V., Frankiln, J.G., Ring, S.M., Grant, A., y McClure, W.F. (1988). The application of Fourier Transformed NIR spectra to quantitative analysis by comparison of similarity indices (CARNAC), *Mikrochim Acta* (Wien), **1**, 61-64.

Davies, A.M.C. (1999). Some variations on a Local theme. *Spectroscopy Europe*, **11**, 22-24.

Davies, A.M.C. (2002). The idea behind comparison analysis using restructured near infrared and constituent data (CARNAC). En A.M.C. Davies, R.K. Cho (Eds.), *Near Infrared Spectroscopy: Proceedings of the 10th International Conference* (p.29-32), West Sussex, U.K.

Day, D.R., Butter, M.A., Smith, M.C., McAllister A., Deutsch, E.R., Zafiriou, K., y Senturia, S.D. (2005). Diffractive MEMS implementation of a Hadamard near-infrared spectrometer. *13th International Conference on solid-state sensors, actuators and Microsystems*, 1246-1249.

Daza, A., Mateos, A., Rey, A.I., y López-Bote, C.J. (2005a). Feeding level in the period previous to the late fattening phase influences fat composition at slaughter in free-ranged iberian pigs. *Archives of Animal Nutrition*, **59**, 277-236.

Daza, A., Rey, A.I., Ruiz, J., y López-Bote, C.J. (2005b). Effects of feeding in free-range conditions or in confinement with different dietary MUFA/PUFA ratios and α -tocopheryl acetate, on antioxidants accumulations and oxidative stability in iberian pigs. *Meat Science*, **69**, 151-163.

Daza, A., Olivares, A., Rey, A.I., Ruiz, J., y López-Bote, C.J. (2006). Iberian pig production: the problems of success. *Options Méditerranéennes Série A*, **78**, 163-171.

Daza, A., López-Bote, C.J., Olivares, A., Menoyo, D., y Ruiz, J. (2007). Age at the beginning of the fattening period of iberian pigs under free-range conditions affects growth, carcass characteristics and fatty acid profile of lipids. *Animal Feed Science and Technology*, **139** (1), 81-91.

Daza, A., Menoyo, D., y López-Bote, C.J. (2009). Carcass traits and fatty acid composition of subcutaneous, intramuscular and liver fat from iberian pigs fed in confinement only with acorns or a formulated diet. *Food Science and Technology International*, **15** (6), 563-569.

De Pedro, E., Garrido, A., Bares, I., Casillas, M., y Murray, I. (1992). Application of near infrared spectroscopy for quality control of iberian pork industry. En K.I. Hildrum, R. Isaksson, T. Naes, y A. Tandberg (Eds.), *Near infrared spectroscopy bridging the gap between data analysis and NIR applications*, (p. 345-348). Ellis Horwood, UK.

De Pedro, E., Garrido, A., Lobo, A., Dardenne, P., y Murray, I. (1995). Objective classification of iberian pig carcasses: GC versus NIR. En G.D. Batten, P.C. Flinn, L.A. Welsh and A.B. Blakeney (Eds.), *Leaping ahead with near infrared spectroscopy*, (p. 291-295). NIR Spectroscopy Group. Royal Australian Chemistry Institute, Melbourne, Australia.

De Pedro, E., Casillas, M., y Miranda, M. (1997). Microwave oven application in the extraction of fat from the subcutaneous tissue of iberian pig ham. *Meat Science*, **45**(1), 45-51.

De Pedro, E. (2001). Calidad de las canales y de los productos del cerdo ibérico: técnicas de control y criterios de calidad. En C. Buxadé (Ed.), *Porcino Ibérico, aspectos claves*, (p. 589-621). Mundiprensa, Madrid.

De Pedro, E., Núñez, N., García, J., Aparicio, D., Campos, M.I., y Pérez, M. (2007). Implementing near infrared spectroscopy in the iberian pig industry. *Options Méditerranéennes Série A*, **76**, 225-228.

Del Moral, F.G., Guillén, L.G., O'Valle, F., Martínez, L., y Del Moral, R.G. (2009). Duroc and iberian pork neural network classification by visible and near infrared reflectance spectroscopy. *Journal of Food Engineering*, **90**, 540-547.

Delgado-Huertas, A., De Pedro-Sanz, E., García-Olmo, J., y Reyes, E. (2007). 15N/14N ratio and quality control of iberian pig carcasses. *Options Méditerranéennes Série A*, **76**, 213-217.

Dhanoa, M.S., Lister, S.J., Sanderson, R., y Barnes, R.J. (1994). The link between multiplicative scatter correction (MSC) and standard normal variate (SNV) transformations of NIR spectra. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, **2**, 43-47.

Díaz, I., García-Regueiro, J.A., Casillas, M., y De Pedro, E. (1996). Triglyceride composition of fresh ham fat from iberian pigs produced with different systems of animal nutrition. *Food Chemistry*, **55** (4), 383-387.

Ding, H., Lu, J.Q., Jacobs, K.M., y Hu, X. (2005). Determination of refractive indices of porcine skin tissues and intralipid at eight wavelengths between 325 and 1557 nm. *Journal of the Optical Society America*, **22** (6), 1151-1157.

Doornbos, R.M., Lang, R., Aalders, M.C., Cross, F.W., y Sterenborg, H.J. (1999). The determination of *in vivo* human tissue optical properties and absolute chromophore concentrations using spatially resolved steady-state diffuse reflectance spectroscopy. *Physics in Medicine and Biology*, **44** (4), 967-81.

Dransfield, E., Ngapo, T.M., Nielsen, N.A., Bredahl, L., Sjöden, P.O., Magnusson, M., Campo M.M., y Nute, G.R. (2005). Consumer choice and suggested price for pork as influenced by its appearance, taste and information concerning country of origin and organic pig production. *Meat Science*, **69**, 61-70.

Du, Y., Hu, X.H., Cariveau, M., Ma, X., Kalmus, G.W., y Lu, J.Q. (2001). Optical properties of porcine skin dermis between 900 nm and 1500 nm. *Physics in Medicine and Biology*, **46**, 167-181.

Duck, F.A. (1990). *Physical properties of tissue: A comprehensive reference book*. Academic Press Limited, London.

Ellis, N.R., y Isbell, H. (1926). Soft pork studies. II. The influence of the character of the ration upon the composition of the body fat of hogs. *Journal of Biological Chemistry*, **69**, 219-238.

EMEA. (2012). *Guideline on the use of near infrared spectroscopy (NIRS) by the pharmaceutical industry and the data requirements for new submissions and variations*. European Medicines Agency.

Esteve, L., y Hurburgh, C. (2010). A tutorial on near infrared spectroscopy and its calibration. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, **40** (4), 246-260.

Eurocarne. (2011). El MARM está abierto a cualquier propuesta del sector ibérico para el cambio en la Norma de Calidad.

www.eurocarne.com/noticias.php?codigo=19409&titulo=marm_esta_abierto_cualquier_propuesta_sector_iberico_cambio_norma_calidad. Accedido el 13/01/2011.

Europaagraria. (2012). ASICI acuerda su propuesta para modificar la Norma de Calidad. www.europaagraria.es/index.php/porcino/57402-asici-acuerda-su-propuesta-para-modificar-la-norma-de-calidad-del-iberico. Accedido el 30/06/2012.

Faber, N.M., y Bro, R. (2002). Standard error of prediction for multiway PLS-1. Background and a simulation study. *Chemometrics and Intelligent Laboratory System*, **61**, 133-149.

Farrell, T.J., Patterson, M.S., y Wilson, B. (1992). A diffusion theory model of spatially-resolved, steady-state diffuse reflectance for the non-invasive determination of tissue optical properties *in vivo*. *Medical Physics*, **19** (4), 879-889.

FDA. (2004). Guidance for industry PAT. A framework for innovative pharmaceutical development, manufacturing and quality assurance. www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070305.pdf. Accedido el 17/05/2011.

Fearn, T. (2001). Standardisation and calibration transfer for near infrared instruments: a review. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, **9**, 229-244.

Fearn, T., Riccioli, C., Garrido-Varo, A., y Guerrero-Ginel, J.E. (2009). On the geometry of SNV and MSC. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, **96**, 22-26.

Fearn, T. (2011). Limitations of Mahalanobis and H distances. *NIRS News*, **22** (8), 16-17.

Fearn, T., y Davies, A.M.C. (2003). Locally-biased regression. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, **11**, 467-478.

Fernández, A., De Pedro, E., Núñez, N., Silió, L., García-Casco, J. y Rodríguez, C. (2003). Genetic parameters for meat and fat quality and carcass composition traits in iberian pigs. *Meat Science*, **64**, 405-410.

Fernández-Cabanás, V.M., Garrido-Varo, A., García-Olmo, J., De Pedro-Sanz, E., y Dardenne, P. (2007). Optimisation of the spectral pre-treatments used for iberian pig fat NIR calibrations. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, **87**, 104-112.

Fernández-Cabanás, V.M., Polvillo, O., Rodríguez-Acuña, R., Botella, B., y Horcada, A. (2011). Rapid determination of the fatty acid profile in pork dry-cured sausages by NIR spectroscopy. *Food Chemistry*, **124** (1), 373-378.

Fernández-Navales, J.F., López, M.I., González-Caballero, V., Ramírez, P., y Sánchez, M.T. (2011). Feasibility of using a miniature NIR spectrometer to

measure volumic mass during alcoholic fermentation. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, **62**, 353-359.

Fernández-Pierna, J.A., Vermeulen, P., Lecler, B., Baeten, V., y Dardenne, P. (2010). Calibration transfer from dispersive instruments to handheld spectrometers. *Applied Spectroscopy*, **64**, 644-648.

Feudale, R.N., Woody, N.A., Tan, H.W., Myles, A.J., Brown, S.D., y Ferre, J. (2002). Transfer of multivariate calibration models: a review. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, **64**, 181-192.

Flores, J., Birón, C., Izquierdo, L., y Nieto, P. (1988). Characterization of green hams from iberian pigs by fast analysis of subcutaneous fat. *Meat Science*, **23**, 253-262.

Gaitán-Jurado, A.J., Ortiz-Somovilla, V., España-España, F., Pérez-Aparicio, J., y De Pedro-Sanz E.J. (2008). Quantitative analysis of pork dry-cured sausages to quality control by NIR spectroscopy. *Meat Science*, **78**(4), 39-399.

Gallardo, E., Narváez-Rivas, M., Pablos, F., y Marcus-Jurado, J. (2012). Subcutaneous fat triacylglycerols profile from iberian pigs as a tool to differentiate between intensive and extensive fattening systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **60**, 1645-1651.

Gamero-Pasadas, A., Viera-Alcaide, I., Ríos, J.J., Graciani Constante, E., Vicario, I.M., y León-Camacho, M. (2006). Characterization and quantification of the hydrocarbons fraction of the subcutaneous fresh fat of iberian pig by off line combination of High performance liquid chromatography and gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, **1123**, 82-91.

García, C., Berdagué, J.L., Antequera, T., López-Bote, C., Córdoba, J.J., y Ventanas, J. (1991). Volatile components of dry-cured iberian ham. *Food Chemistry*, **41**, 23-32.

García, M., Horrillo, M.C., Santos, J.P., Aleizandre, M., Sayago, I., Fernández, M.J., Arés, L., y Gutiérrez, J. (2003). Artificial olfactory system for the classification of iberian hams. *Sensors and Actuators B*, **96**, 621-629.

García, M., Aleizandre, M., Gutiérrez, J., y Horrillo, M.C. (2006). Electronic nose for ham discrimination. *Sensors and Actuators B*, **114**, 418-422.

García-Olmo, J., De Pedro, E., y Garrido-Varo, A. (1998). Methodological aspects on near infrared analysis of iberian pig fat using interactance-reflectance fiber optic mode. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, **6**, 307-312.

García-Olmo, J., Garrido-Varo, A., y De Pedro, E. (2001). The transfer of fatty acid calibration equations using one set of unsealed liquid standardisation samples. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, **9**, 49-62.

García-Olmo, J. (2002). Clasificación y autenticación de canales de cerdo ibérico mediante espectroscopía en el infrarrojo cercano (NIRS). Tesis doctoral. Universidad de Córdoba.

García-Olmo, J., De Pedro, E., Garrido, A., Paredes, A., Sanabria, C., Santolalla, M., Salas, J., García-Hierro, J.R., González, I., García-Cachan, M.D., y Guirao, J. (2002). Determination of the precision of the fatty acid analysis of iberian pig fat by gas chromatography. Results of a mini collaborative study. *Meat Science*, **60**, 103-109.

García-Olmo, J., Garrido-Varo, A., y De Pedro, E. (2009). Classification of real farm conditions iberian pigs according to regime with multivariate models developed by using fatty acids composition or NIR spectral data. *Grasas y Aceites*, **60** (3), 233-237.

García-Torres, S., Tejerina, D., y Ortega, E. (2011). Innate immune response of blood neutrophils in iberian pigs under different production systems. *Livestock Science*, **138**, 304-307.

Garrido-Varo, A., García-Olmo, J., y Pérez-Marín, M.D. (2004). Analysis of Fats and Oils. En C. Roberts, J. Workman y J. Reeves (Eds.) *Near-Infrared Spectroscopy in Agriculture*, (pp. 487-558). Agronomy, Crop Science and Soil Science Societies of America, Madison, WI, USA.

Garrido-Varo, A. (2010). Twenty years of experience on Near Infrared Spectroscopy for the Spanish agro-food industry: lessons learned and future prospects. *The Second Asian NIR Symposium*. Shanghai, China.

Garrido-Varo, A., García-Olmo, J., y Pérez-Marín, D. (2012). Apuntes del curso “Espectroscopía de infrarrojo cercano (NIRS): Aplicaciones en el control de calidad y trazabilidad de productos y procesos”. Universidad de Córdoba.

Gaspar, P., Mesías, F.J., Escribano, M., y Pulido, F. (2008). Gross output and livestock sales in modelling in spanish extensive farms using PLSR. *107th EAAE Seminar «modelling of agricultural and rural development policies»*.

Gaspar, P., Mesías, F.J., Escribano, M., y Pulido, F. (2009). Sustainability in spanish extensive farms (Dehesas): an economic and management indicator based evaluation. *Rangeland Ecology & Management*, **62** (2), 153-162.

Gat, N. (2000). Imaging spectroscopy using tuneable filters: a review. *Proceedings of The International Society for Optical Engineering*, **4056**, 50-64.

Gebhart, S.C., Ling, W.C., y Mahadevan-Jansen, A. (2006). In vitro determination of normal and neoplastic human brain tissue optical properties using inverse adding-doubling. *Physics in Medicine and Biology*, **51**, 2011-2027.

Geladi, P., MacDougall, D., y Martens, H. (1989). Linearization and scatter-correction for near-infrared reflectance spectra of meat. *Applied Spectroscopy*, **39**, 1193-1202.

Geller, Y. (2006). A new approach to NIR spectroscopy allowing remote analysis. LabPlus International. http://www.labint-online.com/uploads/tx_ttproducts/datasheet/a-new-approach-to-nir-spectroscopy-allowing-remote-analysis.pdf. Accedido el 05/10/2011

Geller, Y. (2007). Using MEMS technology for cost effective recycling of plastics. *Proceedings of SPIE*, **6466**.

Gjerlaug-Enger, E., Kongsro, J., Aass, L., Ødegard, J., y Vangen, O. (2011). Prediction of fat quality in pig carcasses by near-infrared spectroscopy. *Animal*, **5**(11), 1829-1841.

González-Martín, I., González-Pérez, C., Hernández-Méndez, J., Marqués-Macías, E., y Sanz-Poveda, F. (1999). Use of isotope analysis to characterize meat from iberian breed swine. *Meat Science*, **52**, 437-441.

González-Martín, I., Pérez-Pavón, J.L., González-Pérez, C., Hernández-Méndez, J., y Álvarez-García, N. (2000). Differentiation of products derived from iberian breed swine by electronic olfactometry (electronic nose). *Analytica Chimica Acta*, **424**, 279-287.

González-Martín, I., González-Pérez, C., Hernández-Méndez, J., y Sánchez-González, C. (2001). Differentiation of dietary regimen of iberian swine by means of isotope analysis of carbon and sulphur in hepatic tissue. *Meat Science*, **58**, 25-30.

González-Martín, I., González-Pérez, C., Hernández-Méndez, J., Álvarez-García, N., y Lázaro, S.M. (2002a). Determination of fatty acids in subcutaneous fat of iberian breed swine by near infrared spectroscopy. A comparative study of the methods for obtaining total lipids: solvents and melting with microwaves, *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, **10**, 257-268.

González-Martín, I., González-Pérez, C., Hernández-Méndez, J., y Álvarez-García, N. (2002b). Mineral analysis (Fe, Zn, Ca, Na, K) of fresh iberian pork loin by near infrared reflectance spectrometry. Determination of Fe, Na and K with a remote fibre-optic reflectance probe. *Analytica Chimica Acta*, **468**, 293-301.

González-Martín, I., González-Pérez, C., Hernández-Méndez, J., Álvarez-García, N., y Hernández Andaluz, J.L. (2002c) On-line non destructive determination of proteins and infiltrated fat in iberian pork loin by near-infrared spectrometry with a remote reflectance fibre optic probe. *Analytica Chimica Acta*, **453**, 281-288.

González-Martín, I., González-Pérez, C., Hernández-Méndez, J., y Álvarez-García, N. (2003). Determination of fatty acids in the subcutaneous fat of iberian breed swine by near infrared spectroscopy (NIRS) with a fiber-optic probe. *Meat Science*, **65**, 713-719.

González-Martín, I., González-Pérez, C., Álvarez-García, N., y González-Cabrera, J.M. (2005). On-line determination of fatty acid composition in intramuscular fat of iberian pork loin by NIRS with a remote reflectance fibre optic probe. *Meat Science*, **69**, 243-248.

González-Martín, I., Fernández Bermejo, C., Hernández-Hierro, J.M., y Sánchez-González, C.I. (2009). Determination of hydroxyproline in cured pork sausages and dry-cured beef products by NIRS technology employing a fiber-optic probe. *Food Control*, **20**, 752-755.

Grunert, K. G., Beach-Larsen, T., y Bredal, L. (2000). Three issues in consumer quality perception and acceptance of dairy products. *International Dairy Journal*, **10**, 575-584.

Guillén, A., Del Moral, F.G., Herrera, L.J., Rubio, G., Rojas, I., Valenzuela, O. y Pomares, H. (2010). Using near-infrared spectroscopy in the classification of white and Iberian pork with neural networks. *Neural Computing and Applications*, **19**, 465-470.

Haaland, D.M., y Thomas, E.V. (1988). Partial least-squares methods for spectral analyses. 1. Relation to other quantitative calibration methods and the extraction of qualitative information. *Analytical Chemistry*, **60**, 1193-1202.

Hansen, C.L., Van der Berg, F., Ringgaard, S., Stodkilde-Jorgensen, H., y Karlsoon, A.H. (2008). Diffusion of NaCl in meat studied by H and NA magnetic resonance imaging. *Meat Science*, **80** (3), 851-856.

Hanssen, L., y Snail, K. (2002) Integrating spheres for mid and near infrared reflection spectroscopy. In *Handbook of Vibrational Spectroscopy*, Chalmers, H.M., y Griffiths, P.R. (Eds.) John Wiley & Sons, Ltd. Chichester, U.K.

Hart, J.R., y Norris, K.H. (1962). Determination of the moisture content of seeds by near-infrared spectrophotometry of their methanol extracts. *Cereal Chemistry*, **39**, 94-99.

Henyey, L.G., y Greenstein, J.L. (1941). Diffuse radiation in the galaxy, *Astrophys Journal*, **93**, 70-83.

Herschel, F.W. (1800). Investigation of the powers of the prismatic colours to heat and illuminate objects. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, **90**, 255-329.

Hervás, C., Garrido, A., Lucena, B., García, N., y De Pedro, E. (1994). Near infrared spectroscopy of iberian pig carcasses using an artificial neural network. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, **2**, 177-184.

Houghton, P.L., y Turlington, L.M. (1992). Application of ultrasound for feeding and finishing animals: A review. *Journal of Animal Science*, **70**, 930-941.

Hoving-Bolink, A.H., Vedder, H.W., Merks, J.W.M., de Klein, W.J.H., Reimert, H.G.M., Frankhuizen, R., van den Broek, W.H.A.M., y Lambooij, E. (2005). Perspective of NIRS measurements early post mortem for prediction of pork quality. *Meat Science*, **69**, 417-423.

Howard, M., y Workman, Y. (2003). *Statistics in Spectroscopy* (2ª Edición). Academic Press, CA, USA.

Iino, K., Maruo, K., Arimoto, H., Hyodo, K., Nakatani, T, y Yamada, Y. (2003). Monte Carlo Simulation of near infrared reflectance spectroscopy in the wavelength range from 1000 nm to 1900 nm. *Optical Review*, **10** (6), 600-606.

Infocalidad. (2013). Nueva normativa de calidad para productos ibéricos. Valoración positiva de AECERIBER. <http://www.infocalidad.net/?noticia=nueva-normativa-de-calidad-para-productos-ibericos>. Accedido el 30/01/2013.

Isabel, B., Cordero, G., López-Bote, C., y Daza, A. (2009). Tocopherol content, weight loss and instrumental color analysis of iberian dry-cured ham as affected by rearing and feeding systems. *Grasas y Aceites*, **60** (3), 248-254.

ISI (2000). The complete software solution using a single screen for routine analysis, robust calibrations and networking. USA: Infracsoft International Sylver Spring MD.

ISO 12099:2010. (2010). Animal feeding stuffs, cereals and milled cereal products. Guidelines for the application of near infrared spectrometry. www.iso.org.

Junta de Andalucía. (2012). Propuesta de la Consejería de Agricultura y Pesca de la Junta de Andalucía sobre modificación de la Norma de Calidad para la carne, y el jamón, paleta y la caña de lomo ibéricos. www.juntadeandalucia.es/agriculturaypesca/portal/export/sites/default/comun/galerias/galeriaDescargas/cap/novedades/home/120427_PROPUESTA_ANDALUCIA_ANTE_LA_NORMA_DE_CALIDAD_DEL_IBERICO.pdf. Accedido el 02/05/2012.

Junta de Extremadura (2012). José Antonio Echávarri entrega el acuerdo estratégico del ibérico extremeño al ministro Miguel Arias Cañete. www.gobex.es/salaprensa/view/press/press/detalle.php?id=4557. Accedido el 12/04/2012.

Jurado, A., García, C., Timón, M.L., y Carraspiso, A.I. (2008). Improvement of dry-cured iberian ham sensory characteristics through the use of a

concentrate high in oleic acid for pig feeding. *Iris Journal of Agricultural and Food Research*, **47**, 195-203.

Jurado, J.M., Jiménez-Lirola, A., Narváez-Rivas, M., Gallardo, E., Pablos, F., León-Camacho, M. (2013). Characterization and quantification of 4-methylsterols and 4,4-dimethylsterols from iberian pig subcutaneous fat by gas chromatography–mass spectrometry and gas chromatography–flame ionization detector and their use to authenticate the fattening systems. *Talanta*, **106**, 14-19.

Keranen, V.T.J., y Makynen, A.J. (2008). Double integrating sphere system for optical parameter determination of industrial suspensions. *Proceedings of SPIE*, **7022**, 70220T.

Lammertyn, J., Peirs, A., De Baerdemaeker, J., y Nicölai, B. (2000). Light penetration properties of NIR radiation in fruit with respect to non-destructive quality assessment. *Postharvest Biology and Technology*, **18**, 121-132.

Lara-Vélez, P. (2011). Evolución de los datos RIBER 2008-2011. *Sólo Cerdo Ibérico*, **26**, 55-71.

Lemus-Flores, C., Ulloa-Arvizu, R., Ramos-Kuri, M., Estrada, F.J., y Alonso, R.A. (2001). Genetic analysis of Mexican hairless pig populations. *Journal of Animal Science*, **79**(12), 3021-3026.

López, M.O., de la Hoz, L., Cambero, M.I., Gallardo, E., Reglero, G., y Ordóñez, J.A. (1992). Volatile compounds of dry hams from iberian pigs. *Meat Science*, **31**, 267-277.

López-Bote, C.J. (1998). Sustained utilization of the iberian pig breed. *Meat Science*, **49**, S17-S27.

López-Bote, C.J., y Rey, A.I. (1998). Procedimiento para diferenciar la alimentación del cerdo ibérico durante el cebo. Patente española P200501998.

López-Bote, C.J., Isabel, B., y Daza, A. (2002). Partial replacement of poly- with monounsaturated fatty acids and vitamin E supplementation in pig diets: effect on fatty acid composition of subcutaneous and intramuscular fat and on fat and lean firmness. *Animal Science*, **22**, 349-358.

Lyndgaard, L.B., Sørensen, K.M., van den Berg, F.V., y Engelsen, S.B. (2011). Depth profiling of porcine adipose tissue by Raman spectroscopy. *Journal of Raman Spectroscopy*, **43** (4), 482-489.

MAGRAMA. (2009). Monográfico carne y embutidos. www.magrama.gob.es/es/alimentacion/temas/consumo-y-comercializacion-y-distribucion-alimentaria/monogr_carne_embutido_09_tcm7-7887.pdf. Accedido el 15/01/2013.

MAGRAMA. (2012a). Encuesta de sacrificio de ganado. www.magrama.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-agrarias/ganaderia/encuestas-sacrificio-ganado/. Accedido el 16/11/2012.

MAGRAMA. (2012b). Registro informativo de organismos independientes de control del ibérico. www.magrama.gob.es/es/alimentacion/temas/calidad-agroalimentaria/calidad-comercial/mesa-del-iberico/riber-publico/default.aspx. Accedido el 19/11/2012.

Malinen, J., Käsäkoski, M., Rikola, R., y Eddison, C.G. (1998). LED-based NIR spectrometer module for handheld and process analyzer applications. *Sensors and Actuators B*, **51**, 220-224.

Manne, R. (1987). Analysis of two partial-least-squares algorithms for multivariate calibration. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, **2**, 187-197.

Martelli, F. (2012). An ABC of near infrared photon migration in tissues: the diffuse regime of propagation. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, **20**, 29-42.

Martens G.C., Shenk, J.S., y Barton II F.E. (1989). Near Infrared reflectance Spectroscopy (NIRS). Analysis of Forage Quality. U.S. Department of Agriculture. Agriculture Handbook n° 643.

Martens, H., y Næs, T. (1985). Multivariate calibration by data compression. En H.A. Martens (Ed.), *Multivariate Calibration. Quantitative Interpretation of Non-selective Chemical Data*, (p. 167-286. Tesis doctoral, Technical University of Norway, Trondheim.

Martens, H. y Martens, M. (2001). Multivariate analysis of quality: an introduction. John Wiley and Sons.

Martín, B. y Sanz, A. (2001). Redes neuronales y sistemas borrosos. RA-MA Editorial, Madrid, España.

Martínez, M.L., Garrido, A., De Pedro, E.J., y Sánchez, L. (1998). Effect of sample heterogeneity on NIR meat analysis: the use of the RMS statistic. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, **6**, 313-320.

Massart, D.L., Vandeginste, B.G.M., Buydens, L.M.C., De Jong, S., Lwei, P.J., y Smeyers-Verbeke, J. (1997). Principal Component. En D.L. Massart, B.G.M. Vandeginste, L.M.C. Buydens, S. De Jong, P.J. Lwei, y J. Smeyers-Verbeke (Eds.), *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics. Part B*. (p. 519-556). Elsevier Science, Amsterdam, The Netherlands.

McClure, W.F., Moody, D., Standfield, D.L., y Kinoshita, O. (2002). Handheld NIR spectrometry: Part II: An economical no –moving parts spectrometer for measuring chlorophyll and moisture. *Applied Spectroscopy*, **56** (6), 720-724.

- McClure, W.F. (2003). 204 years of near infrared technology. Review. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, **11**, 487-518.
- Middelhoek, S. (2000). Celebration of the tenth transducers conference: the past, present and future of transducer research and development. *Sensors and Actuators B*, **82**, 2-23.
- Mitchell, A.D., Scholz, A.M., y Solomon, M.B. (2005). Estimation of body composition of pigs by a near-infrared interactance probe technique. *Archiv Tierzucht*, **6**, 580-591.
- Mørkbak, M.R., Christensent, T., y Gyrd-Hansen, D. (2010). Consumer preferences for safety characteristics in pork. *Consumer Preferences*, **112**, 775-791.
- Mowafy, M., y Gassens, R.G. (1975). Microscopic structure of pig skin. *Journal of Animal Science*, **41**(5), 1281-1290.
- Muriel, E., Ruiz, J., Martín, D., Petró, M.J., y Antequera, T. (2004). Physico-chemical and sensory characteristics of dry-cured loin from different iberian pig lines. *Food Science and Technology International*, **10** (2), 117-123.
- Naes, T., Isaksson, T., y Kowalski, B.R. (1990). Locally Weighted Regression and scatter correction for near infrared reflectance data. *Analytical Chemistry*, **62**, 664-673.
- Naes, T., Isaksson, T., Fearn, T., y Davies, A. (2002). Qualitative analysis/classification. En T. Naes, T. Isaksson, T. Fearn, y A. Davies (Eds.). *A user-friendly guide to multivariate calibration and classification*, (p. 221-265). NIR publications, Chichester, UK.
- Narváez-Rivas, M., León-Camacho, M., y Vicario, I.M. (2009). Fatty acid and triacylglycerol composition of the subcutaneous fat from iberian pigs fattened on the traditional feed: “montanera” effect of anatomical location and length of feeding. *Grasas y Aceites*, **60** (3), 238-247.
- Narváez-Rivas, M., Gallardo, E., Ríos, J.J., y León-Camacho, M. (2010a). A tentative characterization of volatile compounds from iberian dry-cured ham according to different anatomical locations. A detailed study. *Grasas y Aceites*, **61** (4), 369-377.
- Narváez-Rivas, M., Vicario, I.M., Alcalde, M.J., y León-Camacho, M. (2010b). Volatile hydrocarbon profile of iberian dry-cured hams. A possible tool for authentication of hams according to the fattening diet. *Talanta*, **81**, 1224-1228.
- Narváez-Rivas, M., Pablos, F., Jurado, J.M., y León-Camacho, M. (2011). Authentication of fattening diet of iberian pigs according to their volatile compounds profile from raw subcutaneous fat. *Analytical Bioanalytical Chemistry*, **399**, 2115-2122.

Narváez-Rivas, M., Gallardo, E., y León-Camacho, M. (2012). Analysis of volatile compounds from iberian hams: a review. *Grasas y aceites*, 63(4), 432-454.

Nieto, R., y Aguilera, J.F. (2009). Uso del análisis isotópico del carbono y del nitrógeno en la trazabilidad de productos derivados del cerdo ibérico. *Anales*, 22 (1), 105-123.

Niñoles, L., Clemente, G., Ventanas, S., y Benedito, J. (2007). Quality assessment of iberian pigs through backfat ultrasound characterization and fatty acid composition. *Meat Science*, 76, 102-111.

Niñoles, L., Sanjuan, N., Ventanas, S., y Benedito, J. (2008). Ultrasonic and sensory characterization of dry-cured ham fat from iberian pigs with different genetics and feeding backgrounds. *Meat Science*, 80, 896-902.

Niñoles, L., Mulet, A., Ventanas, S., y Benedito, J. (2010). Ultrasonic assessment of the melting behavior in fat from iberian dry-cured hams. *Meat Science*, 85, 26-32.

Niñoles, L., Mulet, A., Ventanas, S., y Benedito, J. (2011). Ultrasonic characterization of *B. femoris* from iberian pigs of different genetics and feeding systems. *Meat Science*, 89, 174-180.

Nørgaard, L., Bro, R., Westad, F., y Engelsen S.B. (2006). A modification of canonical variates analysis to handle highly collinear multivariate data. *Journal of Chemometrics*, 20, 425-435.

Norris, K.H., y Hart, J.R. (1965). Direct spectrophotometric determination of moisture content of grain and seeds. *International Symposium Washington*, 4, 19-25.

Norris, K.H., y Williams, P.C. (1984). Optimization of mathematical treatment of raw near infrared signal in the measurement of protein in hard red spring wheat. I. Influence of particles size. *Cereal Chemistry*. 61, 158-165.

Norris, K., y Davies, A.M.C. (2011). Examining diffuse reflection and transmission spectra more thoroughly: Part 1. Instrument noise. *Spectroscopy Europe/Asia, Tony Davies column*, December 2011.

Norris, K. (2012). Some options for making non-invasive measurements on the human body with near infrared spectroscopy. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 20, 249-254.

Norris, K., y Davies, A.M.C. (2012). Examining diffuse reflection and transmission spectra more thoroughly: Part 2. Samples temperature and sample composition. *NIRS news*, 2, 15-20.

O'Farrell, M., Wold, J.P., Høy, M., Tschud, J., y Schulerud, H. (2010). On-line fat content classification of inhomogeneous pork trimming using

multispectral near infrared interactance. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, **18**(2), 134-146.

Olinger, J.M., Griffiths, P.R. y Burger, T. (2001). Theory of diffuse reflectance in the NIR region. En D.A. Burns y E.W. Ciurezac (Eds.). *Handbook of Near-Infrared Analysis* (2^o edición, revisada y expandida) (p. 19-51). Marcel Dekker, New York, USA.

Optoelectronic. (2007). Optoelectronic applications: Spectroscopy – MEMS put NIR spectroscopy in the hands of non-techies. <http://www.laserfocusworld.com/articles/print/volume-43/issue-6/features/optoelectronic-applications-spectroscopy-mems-put-nir-spectroscopy-in-the-hands-of-non-techies.html>. Accedido el 12/12/2011.

Ortiz-Somovilla, V., España-España, F., Gaitán-Jurado, A.J., Pérez-Aparicio, J., y De Pedro-Sanz, E.J. (2007). Proximate analysis of homogenized and minced mass of pork sausages by NIRS. *Food Chemistry*, **101**(3), 1031-1040.

Osborne, B.G., Fearn, T., y Hindle, P.H. (1993). Practical NIR spectroscopy with applications in food and beverage analysis. En B.G. Osborne, T. Fearn, y P.H. Hindle (Eds.), *Food and beverage analysis*, (p. 11–35). Essex: Longmand.

Osborne, B.G. (2000). Near Infrared Spectroscopy in Food Analysis. En R.A. Meyers (Ed.), *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, John Wiley & Sons Ltd, Chichester, UK.

Parra, V., Petró, M.J., Martín, L., Broncano, J.M., y Timón, M.L. (2010). Modification of the fat composition of the iberian pig using bacillus licheniformis and bacillus subtilis. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **112** (7), 720-726.

Pathak, V., Singh, V.P., y Sanjay, Y. (2011). Ultrasound as a modern tool for carcass evaluation and meat processing: A review. *International Journal of Meat Science*, **1**, 83-92.

Pavia, D.L., Lampman, G.M., Kriz, G.S., y Vyvyan, J.A. (2000). Introduction to spectroscopy, (4^a Edición). Brooks/Cole, Belmont, USA.

Pérez-Juan, M., Afseth, N.K, González, J., Díaz, I., Gispert, M., Font i Furnols, M., Oliver, M.A., y Realini, C.E. (2010). Prediction of fatty acid composition using a NIRS fibre optics probe at two different locations of ham subcutaneous fat. *Food Research International*, **43** (5), 1416-1422.

Pérez-Marín, D., Garrido-Varo, A., De Pedro, E., y Guerrero-Ginel, J.E. (2007a). Chemometric utilities to achieve robustness in liquid NIRS calibrations: application to pig fat analysis. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, **87**, 241-246.

Pérez-Marín, D.C., Garrido-Varo, A., y Guerrero-Ginel, J.E. (2007b). Non-linear regression methods in NIRS quantitative analysis. *Talanta*, **72**(1), 28-42.

Pérez-Marín, D., De Pedro-Sanz, E., Guerrero-Ginel, J.E., y Garrido-Varo, A. (2009a). A feasibility study on the use of near infrared spectroscopy for prediction of the fatty acid profile in live iberian pigs and carcasses. *Meat Science*, **83**, 627-633.

Pérez-Marín, D., Sánchez, M.T., Paz, P., Soriano, M.A., Guerrero, J.E., y Garrido-Varo, A. (2009b). Non-destructive determination of quality parameters in nectarines during on-tree ripening and postharvest storage. *Postharvest Biology and Technology*, **52** (2), 180-188.

Pérez-Marín, D., Fearn, T., Guerrero-Ginel, J.E., y Garrido-Varo, A. (2010a). Robustness in pig fat NIRS calibrations by orthogonal projection. *Chemometrics and Intelligent laboratory Systems*, **100** (1), 36-40.

Pérez-Marín, D., Paz, P., Guerrero, J.E., Garrido-Varo, A., y Sánchez, M.T. (2010b) Miniature handheld NIR sensor for the on-site non-destructive assessment of post-harvest quality and refrigerated storage behavior in plums. *Journal of Food Engineering*, **99** (3), 294-302.

Pérez-Marín, D., Sánchez, M.T., paz, P. González-Dugo, V., y Soriano, M.A. (2011). Postharvest shelf-life discrimination of nectarines produced under different irrigation strategies using NIRS-spectroscopy. *LWT-Food Science and Technology*, **44**(6), 1405-1414.

Pérez-Palacios, T., Ruiz, J., Tejada, J.F., y Antequera, T. (2009). Subcutaneous and intramuscular lipid traits as tools for classifying iberian pigs as a function of their feeding background. *Meat Science*, **81**, 632-640.

Pérez-Palacios, T., Antequera, T., Durán, M.L., Caro, A., Rodríguez, P.G., y Ruiz, J. (2010). MRI-based analysis, lipid composition and sensory traits for studying iberian dry cured hams from pigs fed with different diets. *Food Research International*, **43**, 248-254.

Pérez-Palacios, T., Antequera, T., Durán, M.L., Caro, A., Rodríguez, P.G., y Palacios, R. (2011). MRI-based analysis of feeding background effect on fresh iberian ham. *Food Chemistry*, **16**, 1366-1372.

Perona, J.S., y Ruiz-Gutiérrez, V. (2005). Quantitative lipid composition of iberian pig muscle and adipose tissue by HPLC. *Journal of Liquid Chromatography & related Technologies*, **28** (15), 2445-2457.

Petrón, M.J., Durán, L., Ávila, M., Cernadas, E., y Antequera, T. (2003). A computer vision system to discriminate iberian pigs from ham images. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, **2** (5), 549-557.

Petrón, M.J., Antequera, T., Muriel, E., Tejeda, J.F., y Ventanas, J. (2004a). Linear hydrocarbons content of intramuscular lipids of dry-cured iberian ham. *Meat Science*, **66**, 295-300.

Petrón, M.J., Muriel, E., Timón, M.L., Martín, L., y Antequera, T. (2004b). Fatty acids and triacylglycerols profiles from different types of iberian dry-cured hams. *Meat Science*, **68**, 71-77.

Petrón, M.J., Muriel, E., Tejeda, J.F., Ventanas, J., y Antequera, T. (2006). Effect of duration of the montanera diet on the hydrocarbon fraction of intramuscular lipids from iberian dry-cured ham; characterization by gas chromatography. *Journal of the Science Food and Agriculture*, **86**, 1040-1045.

Pickering, J.W., Prahl, S.A., Van Wieringen, N., Beek, J.F., Henricus, J.C., Sterenborg, M., y Van Gemert, M.J.C. (1993). Double integrating-sphere system for measuring the optical properties of tissue *Applied Optics*, **32** (4), 399-410.

Prado, N., Fernández-Ibáñez, V., González, P., y Soldado, A. (2011). On-site NIR spectroscopy to control the shelf life of pork meat. *Food Analytical Methods*, **4**, 582-589.

Prahl, S.A., Van Gemert, J.C. y Welch, A.J. (1993). Determining the optical properties of turbid media by using the adding-doubling method. *Applied Optics*, **32** (4), 559-568.

Prahl, S.A. (1995). The adding-doubling method. En A.J. Welch y M.J.C. Van Gemert (Eds.), *Optical-Thermal Response of Laser Irradiated Tissue*, (p. 101-129). Plenum Press, New York, USA.

Prahl, S.A., Keijzer, M., Jacques, L., y Welch, A.J. (1989). A Monte Carlo model of light propagation in tissue. *SPIE Institute Series*, **5**, 102-112.

Prahl, S.A. (2010). Everything I think you should know about Inverse Adding Doubling. <http://omlc.ogi.edu/software/iad>. Accedido el 06/06/2012.

Prevolnik, M., Candek-Potokar, M., y Skorjanc, D. (2004). Ability of NIR spectroscopy to predict meat chemical composition and quality. A review. *Czech Journal of Animal Science*, **49**, 500-510.

Prieto, N., Roehe, R., Lavín, P., Batten G., y Andrés, S. (2009). Application of near infrared reflectance spectroscopy to predict meat and meat products quality. A review. *Meat Science*, **83**, 175-186.

Pringle, J., Roberts, C., Kohl, M., y Lekeux, P. (1999). Near infrared spectroscopy in large animals: optical pathlength and influence of hair covering and epidermal pigmentation. *The Veterinary Journal*, **158**, 48-52.

Qiao, J., Ngadi, M.O., Wang, N., Garipey, C., y Prasher, S.O. (2007a). Pork quality and marbling level assessment using hyperspectral imaging system. *Journal of Food Engineering*, **83** (1), 10-16.

Qiao, J., Ngadi, M.O., Wang, N., Gunenc, A., Monroy, M., Garipey, C., y Prasher, S.O. (2007b). Pork quality classification using a hyperspectral imaging system and neural network. *International Journal of Food Engineering*, **3** (1), 1556-3758.

Qiao, J., Ngadi, M.O., Wang, N., Gunenc, A., Monroy, M., Garipey, C., y Prasher, S.O. (2007c). Prediction of drip-loss, pH and color for pork using a hyperspectral imaging technique. *Meat Science*, **76** (1), 1-8.

Qin, J., y Lu, R. (2006). Measurement of the optical properties of apples using hyperspectral diffuse reflectance imaging. En *American Society of Agricultural and Biological Engineers International Meeting*, Oregon, USA.

Qin, J., y Lu, R. (2007). Monte Carlo Simulation of light propagation in apples. *American Society of Agricultural and Biological Engineers International Meeting*, Minnesota, USA.

Ramírez, M.R., y Cava, R. (2007a). Effect of Iberian x Duroc genotype on dry-cured loin quality. *Meat Science*, **76** (2), 333-341.

Ramírez, M.R., y Cava, R. (2007b). Carcass composition and meat quality of three different Iberian-Duroc genotype pigs. *Meat Science*, **75**, 388-396.

Ramírez, M.R., y Cava, R. (2007c). Volatile profiles of dry-cured meat products from three different Iberian x Duroc genotypes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **55**, 1923-1931.

Ramírez, M.R., y Cava, R. (2008). Effect of Iberian x Duroc genotype on composition and sensory properties of dry-cured ham. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **88** (4), 667-675.

Recio, C. (2007) Método de identificación de productos alimenticios. Patente española nº 20070210.

Recio, C. (2010). Método isotópicos como herramienta para determinar la alimentación aportada al cerdo ibérico. (GC-IRMS de ácidos grasos y otras técnicas). *Sólo Cerdo Ibérico*, **23**, 29-45.

Renaudeau, D., Leclercq-Smekens, M., y Herin, M. (2006). Differences in skin characteristics in European (Large White) and Caribbean (Creole) growing pigs with reference to thermoregulation. *Animal Research*, **55**, 209-217.

Rey, A.I., Daza, A., López-Carrasco, C., y López-Bote, C.J. (2006). Feeding iberian pigs with acorns and grass in either free-range or confinement affects the carcass characteristics and fatty acids and tocopherols accumulation in longissimus dorsi muscle and backfat. *Meat Science*, **73**, 66-74.

Rey, A.I., López-Bote, C.J., Daza, A., y Lauridsen, C. (2010). Accumulation and evolution of tocopherols in dry-cured hams from iberian pigs as affected by their feeding and rearing system. *Food Chemistry*, **123**, 1170-1175.

Ripoche, A., y Guillard, A.S. (2001). Determination of fatty acid composition of pork fat by Fourier Transform infrared spectroscopy. *Meat Science*, **58**, 299-304.

Rodríguez-Sánchez J.A., Ripoll, G., y Latorre, M.A. (2010). The influence of age at the beginning of Montanera period on meat characteristics and fat quality of outdoor iberian pigs. *Animal*, **4** (2), 289-294.

Rosenvold, K., y Andersen, H.J. (2003). Factors of significance for pork quality. A review. *Meat Science*, **64**, 219-237.

Ruiz, J., Cava, R., Antequera, T., Martín, L., Ventanas, J., y López-Bote, C. (1998). Prediction of the feeding background of iberian pig using the fatty acid profile of subcutaneous, muscle and hepatic fat. *Meat Science*, **49** (2), 155-163.

Ruiz, J., y Petró, M.J. (2000). Métodos para la clasificación de la materia prima. En J. Ventanas (Ed.), *Tecnología del jamón ibérico: de los sistemas tradicionales a la explotación racional del sabor y el aroma*. (p. 131-160). Mundi-Prensa, Madrid.

Saey, W., Velazco-Roa, M.A., Thennadil, N., Ramon, H., y Nicolai, B.M. (2008). Optical properties of apple skin and flesh in the wavelength range from 350 to 2200 nm. *Applied Optics*, **47** (7), 908-919.

Sánchez del Pulgar, J., Souloulis, C., Carraspiso, E.I., Cappellin, L., Granito, P., Aprea, E., Romano, A., Gasperi, F., y Brasioli, F. (2013). Effect of the pig rearing system on the final volatile profile of iberian dry-cured ham as detected by PTR-ToF-MS. *Meat Science*, **93**(3), 420-423.

Sánchez, M.T., De la Haba, M.J., Guerrero, J.E., Garrido-Varo, A., y Pérez-Marín, D. (2011). Testing of a local approach for the prediction of quality parameters in intact nectarines using a portable NIRS instrument. *Postharvest Biology and Technology*, **60**, 130-135.

Sánchez, M.T., De la Haba, M.J., Serrano, I., y Pérez-Marín, D. (2012a). Application of NIRS for nondestructive measurement of quality parameters in intact oranges during on-tree ripening and at harvest. *Food Analytical Methods*, *in press*, 1-12, doi:10.1007/s12161-021-9490-7.

Sánchez, M.T., De la Haba, M.J., Benítez-López, M., Fernández-Novales, J., Garrido-Varo, A., y Pérez-Marín, D. (2012b). Application of NIRS for nondestructive measurement of quality Non-destructive characterization and quality control of intact strawberries based on NIR spectral data. *Journal of Food Engineering*, **110** (1), 102-108.

Santos, J.P., García, M., Aleizandre, M., Horrillo, M.C., Gutiérrez, J., Sayago, Fernández, M.J., y Arés, L. (2004). Electronic nose for the identification of pig feeding and ripening time in iberian hams. *Meat Science*, **66**, 727-732.

Savitzky, A., y Golay, M.J.E. (1964). Smoothing and differentiation of data by simplified least squares procedures. *Analytical Chemistry*, **36** (8), 1627-1639.

Schuler, L.P., Milne, J.S., Dell, J.M., y Faraone, L. (2009). MEMS-based microspectrometer technologies for NIR and MIR wavelengths. *Journal of Physics D: Applied Physics*, **42**, 1-13.

Senturia, S. (2008). MEMS-enabled products: a growing market segment. <http://industrial-embedded.com/mems-enabled-products-growing-market-segment>. Accedido el 12/12/2011.

Serrano, M.P., Valencia, D.G., Nieto, M., Lázaro, R., y Mateos, G.C. (2008a). Influence of sex and terminal sire line on performance and carcass and meat quality of iberian pigs reared under intensive production systems. *Meat Science*, **78** (4), 420-428.

Serrano, M.P., Valencia, D.G., Fuentetaja, A., Lázaro, R., y Mateos, G.G. (2008b). Effect of gender and castration of females and slaughter weight on performance and carcass and meat quality of iberian pigs reared under intensive management systems. *Meat Science*, **80** (4), 1122-1128.

Serrano, S., Perán, F., Jiménez-Hornero, F.J., y Gutiérrez de Ravé, E. (2012a). Multifractal analysis application to the characterization of fatty infiltration in iberian and white pork sirloins. *Meat Science*, **93**(3), 723-732.

Serrano, A., De Pedro, E., Morera, C., Vázquez, P., Moreno, A., Garrido-Varo, A., Guerrero, J.E., Pérez-Marín, D.C., Fernández-Cabanás, V.M., García-Olmo, J., Núñez-Sánchez, N. (2012b). Individual characterization of Iberian pig through NIRS technology: implementation in Sierra de Sevilla S.A. Proceeding of the 7th International Symposium on the Mediterranean Pig. *Options Méditerranéennes*, **101**, 615-619.

Shenk, J.S., y Westerhaus, M.O. (1991a). Population definition, sample selection and calibration procedures for near infrared spectra and modified partial least squares regression. *Crop Science*, **31**, 469-474.

Shenk, J.S., y Westerhaus, M.O. (1991b). Population structuring of near infrared spectra and modified partial least squares regression. *Crop Science*, **31**, 1548-1555.

Shenk J.S., y Westerhaus, M.O. (1991c). New standardization and calibration procedure for NIRS analytical systems. *Crop Science*, **31**, 1694-1696.

Shenk, J.S. (1992). Networking and calibration transfer. En I. Murray y I.A. Cowe (Eds.). *Making light work: Advances in Near Infrared Spectroscopy*. (p. 649-654). VCH, London, UK.

Shenk, J.S., y Westerhaus, M.O. (1995). Analysis of agriculture and food products by near infrared reflectance spectroscopy. Monograph, NIRSystems.

Shenk, J.S., y Westerhaus, M.O. (1996). Calibration de ISI way. En A.M.C. Davies y P.C. Williams (Eds.). *Near Infrared Spectroscopy: The Future Waves*, (pp. 198-202). NIR Publications. Chichester. U.K.

Shenk, J.S., Westerhaus, M.O., y Berzaghi, P. (1997). Investigation of a LOCAL calibration procedure for near infrared instruments. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, **5**, 223-232.

Shenk, J.S., Workman, J.J. y Westerhaus, M.O. (2001). Application of NIR spectroscopy to agricultural products. En D.A. Burns y E.W. Ciurczak (Eds.) *Handbook of Near Infrared Analysis* (p. 348-383). CRC Press, Florida, USA.

Shenk, J.S. (2004). Standardization and calibration transfer. En C.A. Roberts, J. Workman y J.B. Reeves II (Eds.), *Near-infrared spectroscopy in agriculture* (p.207-230). ASA, CSSA y SSSA, Inc., Wisconsin, USA.

Siesler, H.W., Ozaki, Y., Kawata, S., y Heise, H.M. (2002). Near Infrared Spectroscopy: principles, instruments, applications. Wiley-Vch, Weinhen, Alemania.

Silverman, B.W., y Jones, M.C. (1989). E. Fix and Hodges (1951): an important contribution to nonparametric discriminant analysis and density estimation, International. *Statistical Review*, **57**, 233-247.

SMA. (2007). Life Sciences Process Spectroscopy: at -line and on-line spectroscopy in the food and pharmaceutical industries: 2002-2007. A publication of Process Analytics Consulting LLC. A Joint Venture of Rasmusson & Willey LLC y Strategic Directions International Inc.

Smola, A.J., y Schölkopf, B. (2004). A tutorial on support vector machine. *Statistics and Computing*, **14**, 199-222.

Sørensen, K.M., Petersen, H., y Engelsen, S.B. (2012). An on-line near-infrared (NIR) transmission method for determining depth profiles of fatty acid composition and iodine value in porcine adipose fat tissue. *Applied Spectroscopy*, **66** (2), 218-226.

Sørensen, K.M., Christensen, M. y Engelsen, S.B. (2013). Three-dimensional images of porcine carcass fat quality using spatially resolved near infrared spectroscopy. *NIR News*, 24 (2), 9-11.

Soto, E., de la Hoz, L., Ordóñez, J.A., Herranz, B., Hierro, E., López-Bote, C.J., y Cambero, M.I. (2009). The feeding and rearing systems of iberian pigs affect the lipid composition and texture profile of dry-cured loins. *Journal of Animal and Feed Sciences*, **18**, 78-89.

Soto, E., de la Hoz, L., Ordóñez, J.A., Herranz, B., Hierro, E., López-Bote, C.J., y Cambero, M.I. (2010). Volatile profile and sensory characteristics of

dry-cured loins as affected by feeding level in the period previous to the late fattening phase and by rearing system of iberian pigs. *Journal of Muscle Foods*, **21** (4), 636-657.

Spectroscopy. (2010). Market Profile: Handheld and Portable NIR. *Spectroscopy Online*. Diciembre 2010.

Strenberg, J.C., Stillo, H.S., y Schwendeman, R.H. (1960). Spectrophotometric analysis of multicomponent systems using the least squares method in matrix form. *Analytical Chemistry*, **32**, 84-90.

Suykens, J.A.K., y Vandewalle, J. (1999). Least squares support vector machine classifiers. *Neural Processing Letters*, **9**(3), 293-300.

Svenmarker, P., y Axelsson, J. (2008). Measurements of Optical Properties - Integrating Sphere and Spatially Resolved: Laboratory exercise. Laboratory exercises, Atomic Physics, Universidad de Lund, Suecia.

Tadigadapa, S., y Mateti, K. (2009). Piezoelectric MEMS sensors: state of the art and perspectives. *Measurement Science and Technology*, **20**, 1-30.

Tejeda, J.F., Antequera, T., Ruiz, J., Cava, R., Ventanas, J., y García, C. (1999). Unsaponifiable fraction and n-alkane profile of subcutaneous fat from iberian ham. *Food Science & Technology International*, **5**, 229-233.

Tejeda, J.F., Antequera, T., Martín, L., Ventanas, J., y García, C. (2001). Study of the branched hydrocarbon fraction of intramuscular lipids from iberian fresh ham. *Meat Science*, **58**, 175-179.

Tejeda, J.F., Gandemer, G., Antequera, T., Viau, M., y García, C. (2002). Lipid traits of muscles as related to genotype and fattening diet in iberian pigs: total intramuscular lipids and triacylglycerols. *Meat Science*, **60**, 357-360.

Tejeda, J.F., García, C., Antequera, T., y Ventanas, J. (2005). Método de control analítico de la carne de cerdo. Patente española P9901519.

Tejerina, D., García-Torres, S., Cabeza de Vaca, M., Vázquez, F.M., y Cava, R. (2011). Acorns (*Quercus rotundifolia* Lam.) and grass as natural sources of antioxidants and fatty acids in the montanera feeding of iberian pig: intra and inter annual variations. *Food Chemistry*, **124**, 997-1004.

Tejerina, D., García-Torres, S., Cabeza de Vaca, M., Vázquez, F.M. y Cava, R. (2012a). Effect of production system on physical-chemical, antioxidant and fatty acids composition of Longissimus dorsi and Serratus ventralis muscles from iberian pigs. *Food Chemistry*, **133** (2), 293-299.

Tejerina, D., García-Torres, S., de Vaca, M.C., Vázquez F.M., y Cava, R. (2012b). Study of variability in antioxidant composition and fatty acids profile of Longissimus dorsi and Serratus ventralis muscles from iberian pigs reared in two different Montanera seasons. *Meat Science*, **90** (2), 414-419.

Timón, M.L., Ventanas, J., Martín, L., Tejeda, J., y García, C. (1998). Volatile compounds in supercritical carbon dioxide extract of iberian ham. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **46**, 5143-5150.

Troy, T.L., y Thennadil, S.N. (2001). Optical properties of human skin in the near infrared wavelength range of 1000 to 2200 nm. *Journal of Biomedical Optics*, **6**, 167-76.

Tuchin, V.V. (2007). Tissue optics: light scattering methods and instruments for medical diagnosis (2ª edición). SPIE Press, Bellingham, USA.

UCO. (2011). Manifiesto en defensa de la raza porcina ibérica. www.uco.es/integraldehesa/images/stories/doc/biblioteca/Normativa/nacional/2011_01_12manifiesto.pdf. Accedido el 05/12/2011

UCO-ASICI. (2009). Plan estratégico para el sector porcino ibérico. www.iberico.com/pestrategico.php. Accedido el 2/12/2011.

USPC. (2007). Capítulo general 1119 Near-Infrared Spectrophotometry. USPC Official, Inc.

Van Veen, R.L.P., Sterenborg, H.J.C.M., Pifferi, A., Torricelli, A., y Cubeddu, R. (2004). Determination of VIS-NIR absorption coefficients of mammalian fat, with time- and spatially resolved diffuse reflectance and transmission spectroscopy. OSA Annual BIOMED Topical Meeting.

Vapnik, V. (1998). Statistical Learning Theory. John Wiley and Sons, New York, USA.

Vapnik, V., y Chervonenkis, A. (1964). A note on one class of perceptrons. *Automation and Remote Control*, **25**.

Ventanas, S., Ruiz, J., García, C., y Ventanas, J. (2007a). Preference and juiciness of iberian dry-cured loin as affected by intramuscular fat content, crossbreeding and rearing system. *Meat Science*, **77**, 324-330.

Ventanas, S., Ventanas, J., Tovar, J., García, C., y Estévez, M. (2007b). Extensive feeding versus oleic acid and tocopherol enriched mixed diets for the production of iberian dry-cured hams: Effect on chemical composition, oxidative status and sensory traits. *Meat Science*, **77** (2), 246-256.

Verbeke, W., Pérez-Cueto, F.J.A., de Barcellos, M.D., Krystallis, A., y Grunert, K.G. (2010). European citizen and consumer attitudes and preferences regarding beef and pork. *Meat Science*, **84**, 284-292.

Viera-Alcaide, I., Vicario, I.M., Graciani Constante, E., y León-Camacho, M. (2007). Authentication of fattening diet of iberian pig according to their triacylglycerols profile from subcutaneous fat. *Analytica Chimica Acta*, **596**, 319-324.

Viera-Alcaide, I., Vicario, I.M., Escudero-Gilete, M.L., Graciani Constante, E., y León-Camacho, M. (2008). A multivariate study of the triacylglycerols composition of the subcutaneous adipose tissue of iberian pig in relation to the fattening diet and genotype. *Grasas y Aceites*, **59** (4), 327-336.

Viera-Alcaide, I., Narváez-Rivas, M., Vicario, I.M., Graciani-Constante, E., y León-Camacho, M. (2009). Different fattening systems of iberian pig according to 1-alkene hydrocarbon content in subcutaneous fat. *Grasas y Aceites*, **60** (1), 68-76.

Wang, Y., Veltkamp, D.J., y Kowalski, B.R. (1991). Multivariate instrument standardization. *Analytical Chemistry*, **63**, 2750-2756.

Wang, L., y Jacques, S. (1992). Monte Carlo modeling of light transport in multi-layered tissues in standard C. University of Texas, M.D. Anderson Cancer Center, USA. <http://labs.seas.wustl.edu/bme/wang/mcr5/mcman.pdf>. Accedido el 17/05/2010.

Wang, Y., Lysaght, M.J., y Kowalski, B.R. (1992). Improvement of multivariate calibration through instrument standardization. *Analytical Chemistry*, **64**, 562-564.

Wang, L., Jacques, S., y Zheng, L. (1995). MCML – Monte Carlo modeling of light transport in multi-layered tissues. *Computers Methods and Programs in Biomedicine*, **47**, 131-146.

Weeranantanaphan, J., Downey, G., Allen, P., y Sun, D.W. (2011). A review of near infrared spectroscopy in muscle food analysis: 2005-2010. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, **19**, 61-104.

Wei, H.J., Xing, D., Lu, J.J., Gu, H.M., Wu, G.Y., y Jin, Y. (2005). Determination of optical properties of normal and adenomatous human colon tissues in vitro using integrating sphere techniques. *World Journal of Gastroenterol*, **11**(16), 2413-2419.

Westerhaus, M.O., Biston, R., y Bartiaux-Thill, N. (1990). Proceedings of the Third International Conference on Near Infrared Spectroscopy (p.671-674) (Bélgica).

Williams, P., y Norris, K. (2001a). The physics of near-infrared scattering and chemical principles of near-infrared technology. En P. Williams y K. Norris (Eds.). *Near-Infrared technology in the agricultural and food industries* (2º edición). (p.1-38). American Association of Cereal Chemists Inc., Minnesota, USA.

Williams, P., y Norris, K. (2001b). Variables affecting near-infrared spectroscopic analysis. En P. Williams y K. Norris (Eds.). *Near-Infrared technology in the agricultural and food industries* (2º edición). (p.171-198). American Association of Cereal Chemists Inc., Minnesota, USA.

Williams, P., y Norris, K. (2001c). Near-infrared instrumentation and contemporary near-infrared instrumentation. En P. Williams y K. Norris (Eds.). *Near-Infrared technology in the agricultural and food industries* (2^o edición). (p.109-144). American Association of Cereal Chemists Inc., Minnesota, USA.

Williams, P.C., y Sobering, D. (1996). How do we do it: A brief summary of the methods we use in developing near infrared calibrations. En A.M.C. Davies, P.C. Williams (Eds.), *Near Infrared Spectroscopy: The Future Waves*, (p. 185-188), NIR Publications, Chichester, UK.

Wise, B.M., Gallagher, N.B., Bro, R., y Shaver, J.M. (2006). PLS Toolbox 4.0 for use with MATLAB. Eigenvector Research Inc., Wenatchee, USA. http://mitr.p.lodz.pl/raman/jsurmacki/pliki/zajecia/LMDiT/cw4i5/LMDiT_PL_S_Manual_4.pdf. Accedido el 24/08/2010.

Wold, S. (1987). Principal Component Analysis. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, **2**, 37-52.

Wold, S., y Sjöström, M. (1977). SIMCA: a method for analyzing chemical data in terms of similarity and analogy. En B.R. Kowalski (Ed.), *Chemometrics Theory and Application*, (p. 243-282). *American Chemical Society Symposium Series 52*, Washington D.C., USA.

Wold, S., Antti, H., Lindgren, F., y Ohman, J. (1998). Orthogonal signal correction of near infrared spectra. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, **44**, 175-185.

Wold, S., Sjöström, M., y Erikson, L. (2001). PLS-regression: a basic tool of chemometrics. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, **58**, 109-130.

Wold, J.P., O' Farrell M., y Tschud, J. (2011). On-line determination and control of fat content in batches of beef trimmings by NIR imaging spectroscopy. *Meat Science*, **89**, 317-324.

Wood, J.D. (1984). Fat deposition and the quality of fat tissue in meat animals. En J. Wiseman (Ed). *Fats in animal nutrition*, (p. 407-436). Butterworths, London, U.K.

Wood, J.D., Enser, M., Fisher, A.V., Nute, G.R., Sheard, P.R., Richardson, R.I., Hughers, S.I., y Whittington, F.M. (2008). Fat deposition, fatty acid composition and meat quality: a review. *Meat Science*, **78**, 343-358.

Workman, J.J., y Burns, D.A. (2008). Commercial NIR instrumentation. En D.A. Burns y E.W. Ciureczak. *Handbook of near-infrared analysis*, (p. 67-78). CRC Press, Florida, USA.

Yamada, Y. (1995). Light-tissue interaction and optical imaging in biomedicine. En C.L. Tien (Ed.), *Annual Review of Heat Transfer*, Chapter 1, New York, USA.

Yamada, Y. (2000). Fundamental studies of photon migration in biological tissues and their application to optical tomography. *Optical Review*, **7** (5), 366-374.

Zamora-Rojas, E., Garrido-Varo, Van den Berg, F., Guerrero-Ginel, J.E., y Pérez-Marín, D.C. (2010). Evaluation of a new local modelling approach for large and heterogeneous NIRS data sets. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, **101**(2), 87-94.

Zamora-Rojas, E., Garrido-Varo, A., De Pedro-Sanz, E., Guerrero-Ginel, J.E., y Pérez-Marín, D. (2011). Monitoring NIRS calibrations for use in routine meat analysis as part of iberian pig-breeding programs. *Food Chemistry*, **129**, 1889-1897.

OTRAS APORTACIONES CIENTÍFICAS



COMUNICACIONES A CONGRESOS

Internacionales:

16th International Conference of Near Infrared Spectroscopy (Montpellier, Francia)

- Characterizing and understanding near infrared reflectance spectroscopy properties of iberian pig skin. (Oral)
- Exploring 4th derivative for understanding fatty acids absorption of Iberian pig fat. (Presentación flash)

International Diffuse Reflectance Conference 2012 (Chambersburg, Estados Unidos)

- The path from at-line to *in-situ* NIRS analysis in the iberian pig industry. (Oral)

15th International Conference of Near Infrared Spectroscopy (Ciudad del Cabo, Sudáfrica)

- Developing and monitoring quantitative NIRS models for routine analysis of pork meat. (Comunicación oral).
- Monte Carlo simulation of the source-detector distance effect on NIRS measurements of subcutaneous adipose tissue in pig carcasses. (Póster).
- Simulation study of the quantitative prediction of oleic acid concentrations by NIR spectroscopy in pig carcasses. (Póster).

VII International Symposium on the Mediterranean Pig. (Córdoba, España)

- Evaluation of a handheld near infrared (NIR) spectrometer for the discrimination of iberian pigs according to their feeding regime (Comunicación oral).
- NIRS spectra repeatability of intact versus ground iberian pork loins (Póster)
- Non-destructive analysis of fresh iberian pork loins by Near-Infrared Spectroscopy (NIRS) (Póster)

International Diffuse Reflectance Conference 2010 (Chambersburg, Estados Unidos)

- Instantaneous iberian pig adipose tissue classification: A comparison of two spectral ranges. (Póster)

IV Conference NIR on the Go. (Padova, Italia)

- On-line near infrared classification of iberian pigs carcasses according to their feeding regime. (Póster). *Galardonado con el mejor póster del congreso.*

14th International Conference of Near Infrared Spectroscopy. (Bangkok, Tailandia).

- Non-destructive *in vivo* classification of iberian pigs measured with a handheld NIR digital transform spectrometer. (Comunicación oral).
- Influence of the instrument setting parameters on the repeatability of NIR spectra of intact pork loins analyzed with a handheld spectrometer. (Póster).

16th International Conference of Near Infrared Spectroscopy (Montpellier, Francia)



Characterizing and understanding near infrared reflectance spectroscopy properties of iberian pig skin

Zamora-Rojas, E.*¹, Aernouts, B.², Garrido-Varo, A.¹, Pérez-Marín, D.C.¹, Guerrero-Ginel, J.E.¹, Yukio Y.³ and Saeys, W.²

¹ Department of Animal Production, Non-Destructive Spectral Sensor Unit, Faculty of Agricultural and Forestry Engineering, University of Córdoba, Agrifood Campus of International Excellence (ceiA3), Campus Rabanales, N-IV, km 396, Córdoba, 14014, Spain.

² Department of Biosystems, Division of Mechatronics, Biostatistics and Sensors, University of Leuven, Kasteelpark Arenberg 30, Leuven, 3001, Belgium.

³ Department of Mechanical Engineering and Intelligent Systems, University of Electro-Communications, Chofu, Tokyo, 182-8585, Japan.

Keywords: near infrared reflectance spectroscopy, pig skin, optical properties, depth profile, Monte Carlo simulation

Introduction

When NIRS measurements are collected on living pigs or intact pig carcasses, the captured light has to travel through the skin before reaching the layer of interest being scattered by the complex structure of the pig skin tissue. In this paper, we give an overview of a study where first the three main tissues types in pig skin were optically characterized. Secondly, the obtained bulk optical properties were used to simulate the light penetration depth in the case of non-invasive pig skin reflectance measurements being essential to understand the contribution of each layer to a measured signal.

Materials and methods

Iberian pig skin tissue samples, obtained post-mortem near the tail insertion area at a Spanish slaughterhouse, were used for *in vitro* double integrating spheres (DIS) measurements. The samples were frozen by liquid nitrogen and kept at -20°C until 24 hours before the analysis. Epidermis and subcutaneous adipose tissues were sliced in thin cuts of 550 µm thickness, while dermis samples were cut to 1100 µm thickness using a cryostat (Microm HM 560, Prosan) at -10°C. The sample diameter was 30 mm. Immediately before

analysis, samples were placed in a cuvette and biological water (0.9 % NaCl) was added to reduce the refractive index mismatch between glass and sample.

A DIS and unscattered transmittance measuring system, composed of a novel wavelength tuneable spectroscopic setup based on a supercontinuum laser, was used for acquiring total reflectance (M_R), total transmittance (M_T) and unscattered/collimated transmittance (M_U) in the wavelength range 1150-1850 nm, with an interval step of 10 nm. The tissue layers were sandwiched between two optical borosilicate glass slides (1.1 mm wall thickness) separated by a spacer of 550 μm or 1100 μm (pathlength), depending on the sample thickness. The methodology described by Prahl (2010)²¹ was followed for instrumental calibration and sample analysis. Automatic control of the system (laser, monochromator and detectors) was obtained through a purpose-designed program in LabView 8.5 (National Instruments, Austin, TX).

A MATLAB (ver 7.10, The Mathworks Inc., Massachusetts, USA) code was designed to calculate M_R , M_T and M_U from the DIS measurements. From these measurements, the absorption coefficient (μ_a), reduced scattering coefficient (μ'_s) and anisotropy factor (g) were estimated using the IAD program provided by Prof. Scott Prahl at the Oregon Laser Research Center. The scattering coefficient (μ_s) was calculated from μ'_s and g , based on the formula $\mu_s = \frac{\mu'_s}{(1-g)}$.

Later on, a Monte Carlo (MC) method, widely used in strongly scattering media such as human skin tissues for simulating light scattering and absorption, was used for simulating the light propagation through pig skin in the wavelength range 1150-1850 nm. As the thickness and refractive index of each tissue layer are required for this simulation; the following average value for the NIR wavelength range were used: 55 μm (thickness) and 1.41 (refractive index) for epidermis, 3.82 mm and 1.36 for dermis and 2.5 cm (thickness for the first subcutaneous adipose tissue layer), 2.6 cm (thickness for the second subcutaneous adipose tissue layer) and 1.37 (refractive index) for hypodermis were used. The optical design of a centered light source and a detector ring arranged concentrically around the source was used (600 μm thick ring) was simulated.

Results and discussion

Figure 1 shows the average bulk optical properties (μ_a , μ_s and g) estimated with the IAD method for the different pig tissue layers. Epidermis and dermis absorption coefficient showed a clear absorption at the water-related absorption band (1400-1480 nm) and a small peak around 1800 nm probably due to protein (collagen), while the subcutaneous adipose tissue absorption

²¹ <http://omlc.ogi.edu/software/iad>

coefficient was dominated by water and lipids (Figure 1a). Spectral dependence of the scattering coefficient of porcine epidermis, dermis and hypodermis tissues were decreasing with the increasing wavelength (Figure 1b), like the scattering coefficient spectra reported by many other biological tissues. It was observed that the values varied between tissues. Subcutaneous adipose tissue presented the highest scattering coefficient spectra in comparison to the other two skin layers, probably due to its tissue structure composed of numerous and small adipocytes. The estimated values for the anisotropy factor (g) varied between 0.94 and 0.98 with a stable spectral behaviour, although it was influenced by the strong water absorption at 1400-1480 nm (Figure 1c).

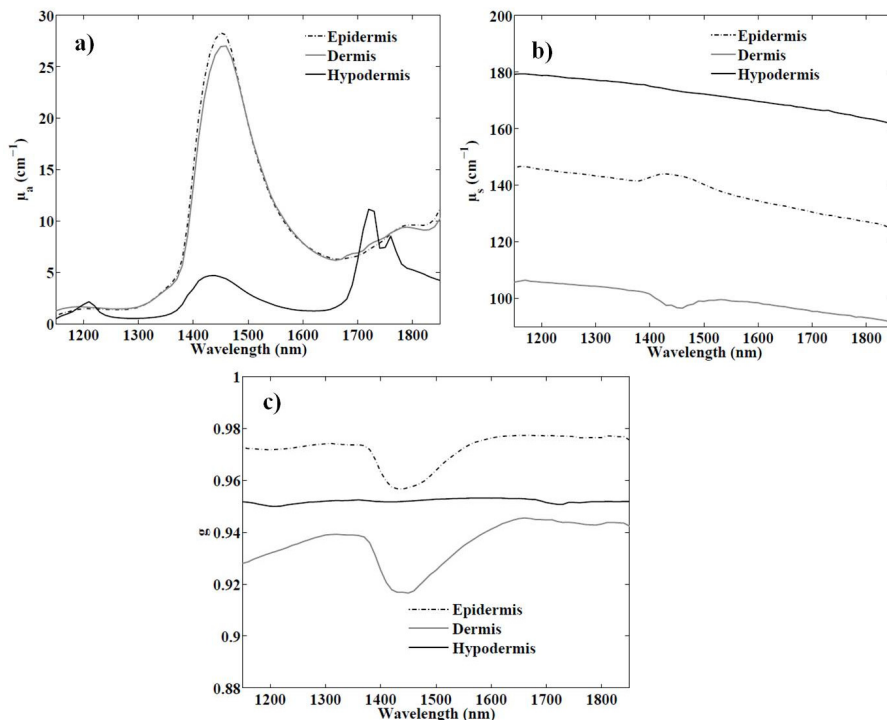


Figure 1. Optical properties for each pig skin layer in the wavelength range 1150-1850 nm. a) absorption coefficient; b) scattering coefficient; c) anisotropy factor.

One of the difficulties in this study was to obtain a clean pig epidermis sample with an adequate thickness to allow better characterization of this layer. Further work should be done regarding epidermis sample preparation to obtain a sample thickness lower than 500 μm to be measured in the DIS system.

Figure 2 shows the fraction of energy absorbed at each layer simulated by the Monte Carlo method. These simulation results indicate the theoretical percentages of photons absorbed by the different layers. It was observed that

larger absorption percentages occurred in the dermis, although the water (absorption peak around 1440 nm) in the epidermis also had a big influence. Subcutaneous adipose tissue absorbed photons mainly at short NIR wavelengths between 1150 and 1340 nm and a little at 1550-1850 nm. This indicates that the light penetration depth was strongly influence by the absorption coefficients of the tissue.

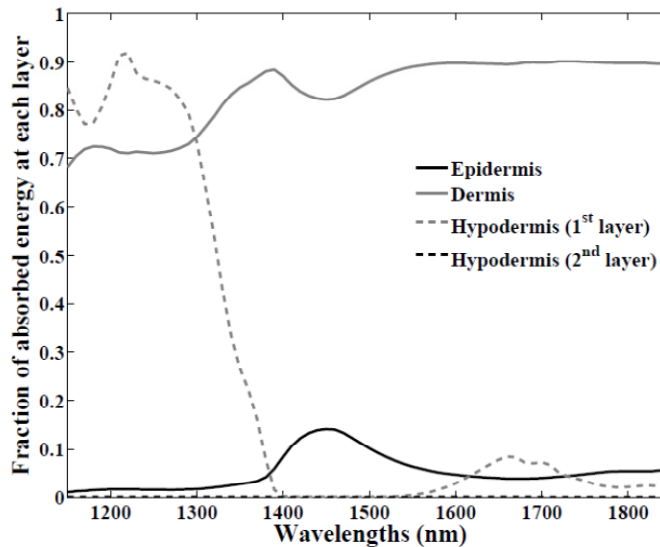


Figure 2. Fraction of absorbed energy at each layer for the wavelength range 1150-1850 nm. *Hypodermis values have been multiplied by a factor of 10 time for the graph.*

The signal was dominated in all the cases by the structure and composition of the dermis layer. This suggests that NIR spectra measurements collected *in vivo* in this wavelength range were based on spectra information coming mainly from the dermis. This is relevant in order to interpret or develop quantitative and/or qualitative models based on this kind of non-destructive NIRS analysis.

Conclusion

The optical properties of pig epidermis, dermis and subcutaneous adipose tissue have been determined by DIS measurements. Absorption coefficients were dominated by water for epidermis and dermis, while it was dominated by water and lipid bands for hypodermis. The scattering coefficient spectra showed a steady decrease with increasing wavelength. Anisotropy showed a stable value for each layer, although some signatures were observed at strong absorption bands. MC simulation results showed that diffuse reflectance NIR spectra from pig skin are dominated by the dermis characteristics.

Novelty Statement

A novel DIS system has been used for optical characterization of different in-vitro pig skin tissues. A Monte Carlo method showed the interaction of the NIR radiation with the pig tissue. Dermis is the main layer that contributed to the diffuse reflected signal.

Summary

In this study, the different layers of the pig skin were optically characterized in the wavelength range 1150-1850 nm with a novel DIS system in combination with an IAD light propagation model. Absorption coefficient spectra were dominated by water and lipid absorption bands. Scattering coefficient spectra decreased smoothly with increasing wavelength and different values were observed for the different tissue layers. The diffuse reflectance spectra of pig skin were statistically simulated with a MC method showing that most of the energy was absorbed by the dermis layer.

16th International Conference of Near Infrared Spectroscopy (Montpellier, Francia)



Exploring 4th derivative for understanding fatty acids absorption of iberian pig fat

Zamora-Rojas, E.*¹, Norris, K.H.², Pérez-Marín, D.C.¹, De Pedro-Sanz, E.¹, Guerrero-Ginel, J.E.¹, and Garrido-Varo, A¹.

¹ Department of Animal Production, Non-destructive Spectral Sensor Unit, Faculty of Agricultural and Forestry Engineering University of Córdoba, Agrifood Campus of International Excellence (ceiA3), Campus Rabanales, N-IV, km 396, Córdoba, 14014, Spain.

² Consultant, Montgomery Road, Beltsville, 11204, United State of America.

Keywords: Fatty acids, pig fat, fourth derivative, band interpretation, NIRS analysis

Introduction

NIRS combined with multivariate mathematical modeling has proved its potential as a quality control system for meat products and the precise determination of fatty acids (FAs). Further knowledge about the main absorption bands of FAs will help to design simpler and lower cost instruments. Some authors have published that the 4th derivative could reveal interesting attributes in NIR data spectra. The purpose of this paper is to explore the ability of the 4th derivative in relation to absorption properties of the FAs.

Materials and methods

Fourteen samples of subcutaneous adipose tissues from Iberian pigs fed under different regimes (which differed mainly in their oleic acid composition) were taken at several Spanish slaughterhouses (set A). Subcutaneous adipose tissue samples were obtained from the tail insertion area of carcasses around 2 hours post-slaughter. Seven of the animals were reared in free-range and fed on acorn and grass (“Acorn”), while the other seven Iberian pigs were fed in intensive systems on compound feeds (“Feed”). Adipose tissues were melted on a microwave and stored at -20°C until 24 hours before the NIRS analysis.

A NIRSystems 6500 spectrophotometer (Foss NIRSystems Inc., Sylver Spring, MD, USA) equipped with a spinning module was used for transmittance analysis. The spectrophotometer worked in the 400-2500 nm range with an interval step between wavelengths of 2 nm. Melted fat were analyzed using folded-transmission gold reflector cups with a pathlength of

0.1 mm. Duplicate spectra were collected per sample. Reference analysis for oleic, linoleic, palmitic and stearic acids were performed by Gas Chromatography (GC).

Pure fatty acids (oleic, linoleic, palmitic and stearic) reflectance spectra (set B) recorded by Dr. Karl Norris on a digitized Cary14 spectrophotometer (1000-2636 nm with an interval step of 1.6 nm) were used as reference spectra.

In a first step, set A and set B were trimmed to the same wavelength range (1000-2500 nm) and to an interval step between wavelengths (2 nm) using a piecewise interpolation function available in MATLAB (ver 7.10, The Mathworks Inc., Massachusetts, USA). Then, the 4th derivatives with different gap sizes (5, 10, 15 and 20 points) were performed using The Unscrambler software on the data set (ver 10.2, CAMO Software AS, Oslo, Norway).

Results and discussion

FA profile of the IP fat analyzed by GC showed clear differences between feeding regimes (Table 1). While “Acorn” animals had higher percentages of oleic and linoleic acids, “Feed” samples were higher in palmitic and stearic acids. This is related to the different rearing and feeding system followed during the two last months prior to be slaughtered.

Table 1. Average percentage of main fatty acids in Iberian pig adipose tissue analyzed by GC.

	Acorn				Feed				
	Min.	Max.	Mean	S.D.	Max.	Min.	Mean	S.D.	SEL
Oleic (C18:1) (%)	54.6	59.1	57.24	1.41	43.1	48.1	46.68	1.77	0.25
Linoleic (C18:2) (%)	7.6	10.7	9.30	1.17	6.2	7.9	7.28	0.62	0.15
Palmitic (C16:0) (%)	17.3	19.6	18.87	0.82	24.9	26.3	25.40	0.58	0.26
Stearic (C18:0) (%)	7.3	10.9	8.40	1.19	11.9	17.0	13.78	1.65	0.22

Min.: minimum; Max.: maximum; S.D.: Standard Deviation; SEL: Standard Error of Laboratory

Fig 1 presents the log(1/R) NIR spectra of pure fatty acids analyzed in reflectance mode (Fig 1a) belonging to the set B and the average transreflectance spectra of the set A samples (Fig 1b). In both cases, it was observed five mayor absorption regions around 1180-1240, 1390-1450, 1680-1780, 2140-2150 and 2270-2450 nm, which are the traditionally assigned to the absorption

of lipid/fat. The absorption bands were quite well defined in the case of pure fatty acids, while in melted pig fat in some of the above regions were broad bands. Oleic and linoleic acids (both unsaturated fatty acids) showed a similar spectra shape different from the one of palmitic and stearic (both saturated fatty acids), which is quite similar between them (Fig 1a). Otherwise, “Acorn” and “Feed” transfectance NIR spectra were very similar showing an offset due probably to scattering effects (Fig 1b).

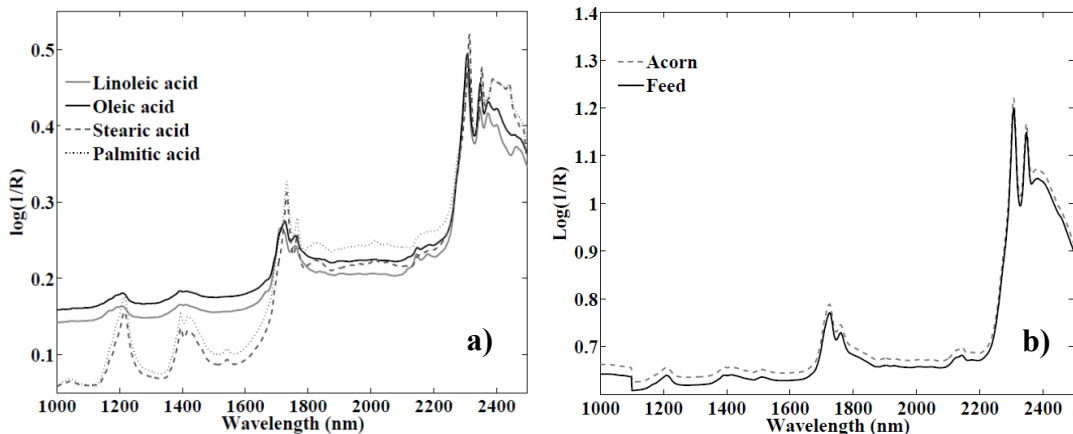


Figure 1. NIR spectra of pure fatty acids (a) and pig melted fat (b).

The effect of the gap size in the 4th derivative is demonstrated on Fig 2. The peak at the wavelength 1100 nm was due to that the monochromator used had two detectors. A gap size of 5 points (Fig 2a) for the 4th derivative of the average melted fat spectra of set A showed the main absorption regions due to the chemical composition of the sample as in the case of other gap sizes. A gap of 5 points for the 4th derivative was selected as the optimum gap size due to the well-defined absorption bands in the spectra. Larger gap sizes showed distortion of narrow-band absorbers, especially for pure FAs.

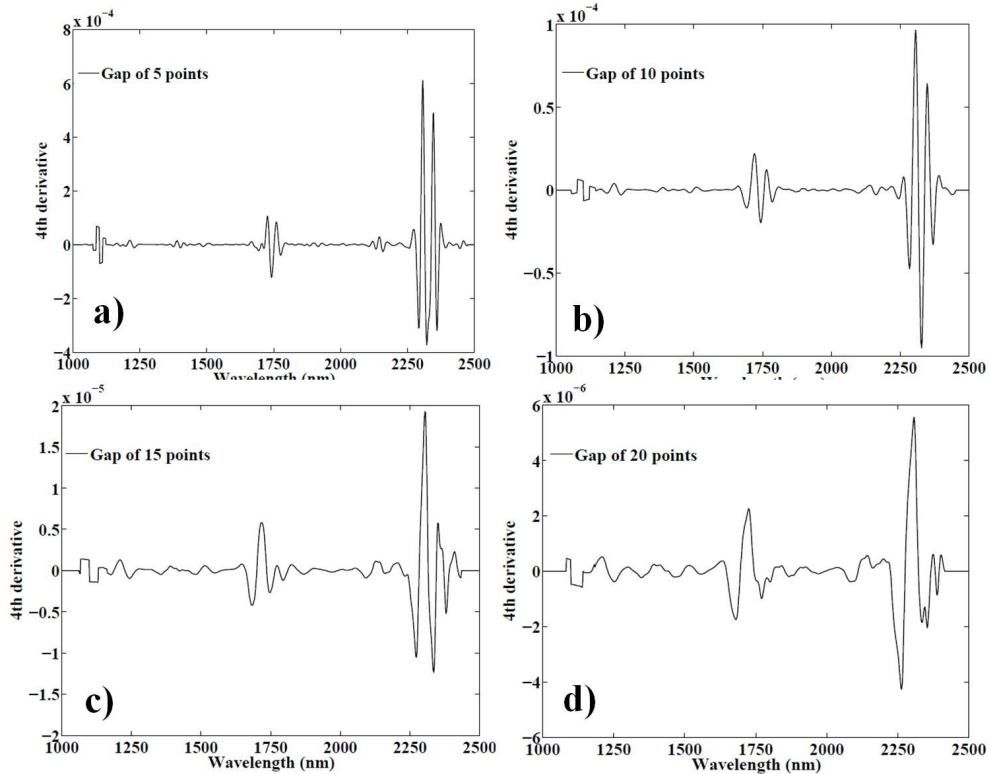


Figure 2. Fourth derivative of the average melted fat spectrum of set A with different gap sizes five points (a), ten points (b), fifteen points (c) and twenty points (d).

Fig 3 shows the 4th derivative (5 points as gap size) for the each pure FA (set B) and for the average spectra of each pig feeding regime of the set A compared to the raw spectra of each case. These results allow us to see the different absorption bands in each pure FA and in IP melted fat inside the broad well-known bands of particular interest in the spectra of oils and fats. Oleic and linoleic acids presented a similar 4th derivative shape between them with almost the same absorption bands (Fig 3a and Fig 3b, respectively). Otherwise, palmitic and stearic acids showed the same pattern between them in the 4th derivative spectra with some small differences (Fig 3c and Fig 3d, respectively). Stearic and palmitic acids showed absorption bands at 1140-1240, 1350-1470, 1530-1570, 1995-2035 and 2400-2470 nm that nor appear or have not relevance in the case of the unsaturated acids. However, it was observed some common ranges of absorption bands between the four main FAs at 1660-1880, 2110-2170 and 2240-2400 nm, although some shifts were observed between saturated and unsaturated acids in those regions. Table 2 shows the wavelength shifts observed between both saturated and unsaturated acids, independently.

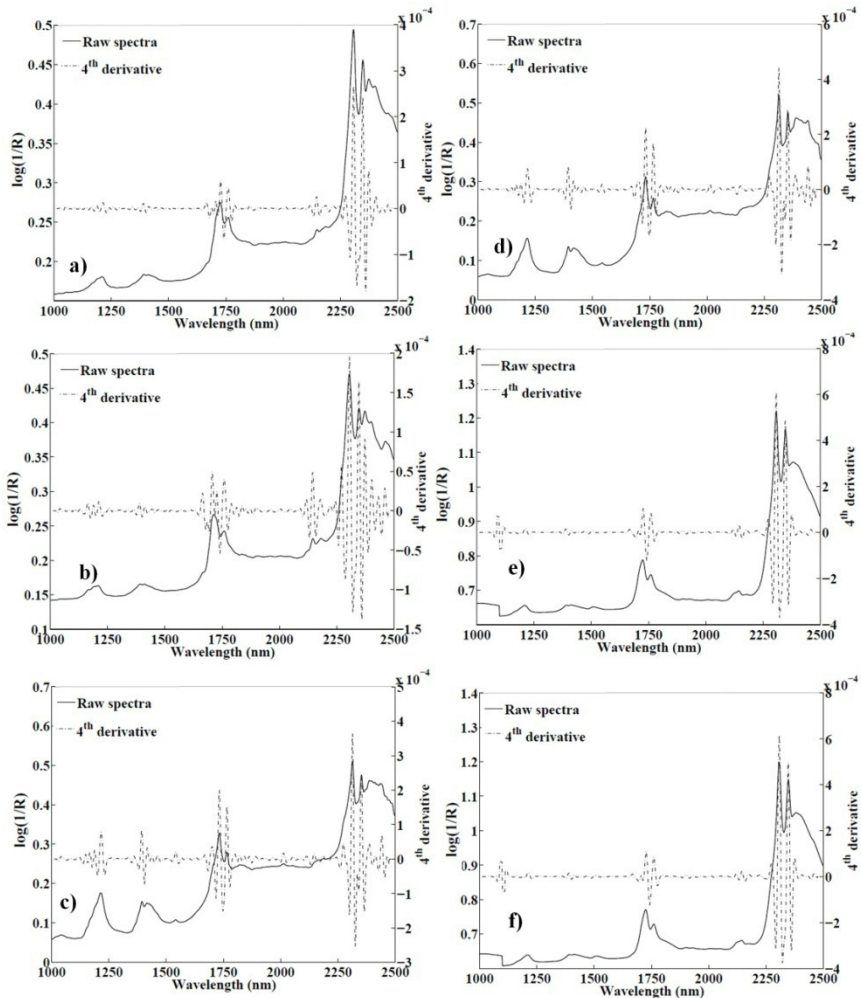


Figure 3. Raw and 4th derivative (5 points as gap size) spectra of pure fatty acids (oleic (a), linoleic (b), palmitic (c) and stearic (d) acids and average pig melted fat for each feeding regime (“Acorn” (e) and “Feed” (f)).

Table 2. Wavelength shifts within the two unsaturated acids and within the two saturated fatty acids, independently.

	Unsaturated acids	Saturated acids
Band peaks (nm) for each pair of fatty acids showing a wavelength shift	1186-1192	1356-1374
	1386-1394	2140-2240
	1658-1670	
	2110-2128	
	2142-2150	
	2170-2220	
	2304-2308	
	2344-2352	
	2366-2380	

“Acorn” (Fig 3e) and “Feed” (Fig 3f) 4th derivative spectra indicated that the spectral information was dominated by oleic acid. Three main absorption regions were noticed: 1660-1820, 2100-2190 and 2250-2400 nm, although at around 1212, 1380-1420 nm were also observed some small peaks. This is in accordance with previous results of other authors in the study of oil and fat NIR spectra using a second derivative. Nevertheless, the advantage of the 4th derivative after optimization of the gap size lies in the observation of narrow-absorbers within broad absorption bands. In fact, some bands were noticed to may be more related to linoleic (1800-1940, 2260 and 2460 nm) or stearic/palmitic (2274 nm) in the 4th derivative spectra of pig melted fat. Differences between “Acorn” and “Feed” 4th derivative spectra were very small. Some wavelength shifts were observed at 1726-1728 and 2120-2122 nm regions between both feeding regimes.

Conclusion

The 4th derivative with a carefully chosen gap size can be used to understand NIR spectra and get sample chemical information. Wavelengths related to specific FAs have been highlighted. Stearic and palmitic acids showed the same spectra pattern, while oleic and linoleic were quite similar within but different from the other two. IP fat spectra measured in transfectance were dominated by oleic acid. Nevertheless, some features were observed due to the presence of other fatty acids. New NIR instrumental designs must consider at least the main wavelength regions presented in this study.

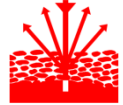
Novelty Statement

The 4th derivative was used for exploring and understanding transfectance NIR spectra of melted pork fat. Wavelengths related to specific FAs have been highlighted. It has been observed that IP melted fat spectra were dominated by oleic acid, although some interactions were found due to other FAs.

Summary

Quantitative NIRS models for FA prediction are based on multivariate modeling combined with scatter pretreatments to extract relevant information. However, NIR spectra are complex data matrixes due to its broad and overlapping absorption bands. We try to understand and to identify sample chemical information in the spectra of pig fat using the 4th derivative. Oleic and linoleic acids showed a similar pattern, while stearic and palmitic had a different one quite similar between both two. Pig melted fat NIR spectra were dominated by oleic acid, although some wavelength shifts were observed.

**International Diffuse Reflectance Conference 2012
(Chambersburg, Estados Unidos)**



IDRC 2012 Chambersburg JULY 28 - AUGUST 3



**The path from *at-line* to *in-situ*
NIRS analysis in the Iberian pig
industry**

Ana Garrido -Varo, E. Zamora-Rojas, D. Pérez-Marín, E. de Pedro
and J.E Guerrero-Ginel

Faculty of Agricultural and Forestry Engineering
University of Córdoba (Spain)

15th International Conference of Near Infrared Spectroscopy (Ciudad del Cabo, Sudáfrica)



Developing and monitoring quantitative NIR spectroscopic models for routine analysis of pork meat

Eduardo Zamora-Rojas*, Ana Garrido-Varo, José Emilio Guerrero-Ginel,
Emiliano de Pedro-Sanz and Dolores Pérez-Marín

Department of Animal Production, Faculty of Agricultural and Forestry
Engineering, University of Córdoba, Agrifood Campus of International
Excellence (ceiA3), Córdoba, 14014, Spain.

*Corresponding author: e.zamora@uco.es

Introduction

A large number of papers have shown the ability of near infrared (NIR) spectroscopy to predict quality attributes in meat and meat products.¹⁻⁴ However, none of the published papers show in detail the complexity of developing and maintaining calibration models applicable in routine analysis. Moreover, most studies are muscle-specific, i.e. only one muscle type is used. In some situations, such as annual breeding programs or in quality control of raw materials used to produce final products composed of a mixture of muscles, it is desirable to analyse multiple muscles and hence development of calibrations requires the inclusion of multiple muscle types. Furthermore, based on the experience of many years by the authors' research group in routine analysis procedures are required to control unexpected results. Although the sample presentation/analysis is standardised or the instrument diagnosis informs that the instrument is working properly, the statistics used to check the certainty of the NIR prediction of unknown samples can be out of the limit control specified in the literature. This paper evaluates a methodology for developing and maintaining routine NIR models for the quantitative prediction of fat, moisture and protein in pork meat. The methodology evaluated is to predict new unknown samples of different times with certainty avoiding the need to send unnecessary samples to wet chemistry laboratories, saving money and time.

Materials and Methods

Sample set and NIR analysis

Three Iberian pork muscles (*gluteus medius* (3.3 % of the total number of samples), *masseter* (11.3 % of the total) and *longissimus dorsi* (85.4 % of the

total)) collected over 1999, 2000, 2001, 2002, 2003, 2004 and 2009 at different slaughterhouses were used for the calibration and validation process. The samples were divided in two sets: 316 samples (set A) collected over 1999-2004 and 514 samples (set B) collected in 2009. Each muscle was ground, homogenised and analysed independently.

A Foss NIRSystems 6500 spectrometer (Foss-NIRSystems Inc., Silver Spring, MD, USA), equipped with a spinning module and the WinISI software package ver 1.50 (Infrasoft International, Port Matilda, PA, USA) were used for spectral acquisition and chemometric analysis, respectively. Two sub-samples were analysed for each sample using standard circular cups (diameter 3.5 cm). A root mean squared (RMS) value of $11\ 250\mu\log(1/R)$ was used to control the spectra repeatability.

Samples were analysed by wet chemistry in the same year of collection and NIR analysis. Fat content was determined following the Soxhlet procedure (ISO-R-1443). Total protein was determined by the Kjeldahl method (ISO-R-937) and moisture content was measured by oven drying to constant weight at 100°C in accordance with ISO-R-1442. All values are expressed as percentage (%) of wet weight.

Spectral data treatment and calibration

Calibration models were developed with set A. Principal component analysis (PCA) was performed on set A ($n = 316$) samples in order to decompose and compress the data matrix. After PCA, the centre of the spectral population was determined in order to detect outlier samples. The global distance (GH) was calculated between each sample and the centre; samples with a GH value greater than 3 were considered outliers.⁵ As spectral pretreatments, the standard normal variate (SNV) plus detrending (DT)⁶ procedures were used to remove the multiplicative interferences of scatter, and two derivative mathematical treatments were evaluated: first and second derivative.

Modified partial least squares (MPLS) regression⁷ was used for the prediction of fat, moisture and protein in pork in the 1100–2500 nm range. Chemical outliers were analysed using Student's *T* statistic.⁸ The following statistics were used to select the best equations: standard error of calibration (SEC), standard error of cross-validation (SECV), and determination coefficient of cross-validation (R^2_{CV}), based on four cross validations groups. The other statistic used was residual predictive deviation (RPD_{CV})⁹, calculated as the ratio between the standard deviation of the reference data for the training set and the SECV. According to Williams & Sobering (1996),⁹ a model is suitable for screening purposes if the RPD is greater than 3.

Prediction and maintenance of calibration models

The fat, protein and water contents of 514 samples of *longissimus dorsi* analysed in 2009 (set B) were predicted with the best calibration models

obtained for each parameter. The statistics, global Mahalanobis (GH) distance, which calculates the distance between a sample and the centre of the training set (values higher than 3-4 are deemed far from the training set), and neighborhood Mahalanobis (NH) distance, which indicates how far a sample is from the most similar samples in the training set (values higher than 0.6-1.2 denote samples with few close neighbors in the training set),⁷ were calculated to evaluate the certainty of the predictions.

Recalibration samples were selected on the basis of: $GH > 3.0$, $NH > 1.0$ and initial NIRS prediction values, to try to fill gaps in the library concerning each parameter and, therefore, have a more representative reference set for the range of each parameter.

The standard error of differences (SED) calculated as the difference between prediction values of a common sample set before and after recalibration was used to compare the performance of both models.

Results and Discussion

The PCA of set A (316 samples) did not show any pattern related to the muscle type. The GH indicated 6 samples with values larger than 3. Examination of the reference data showed that these samples were extreme mainly in terms of percentage fat content (greater than 21 % in two, and below 4 % in the other four). Once spectral outliers had been removed a set consisting of 310 samples of three different muscles was used to develop calibration models. The calibration models obtained showed R^2_{CV} equal to or above 0.9 for all parameters. Fat displayed a SECV of 0.36%, moisture 0.42 % and protein 0.50 % (Table 2, set A). The RPD_{CV} indicated adequate values for fat and moisture with values larger than 3. The lower RPD_{CV} for protein compared to fat and moisture was due to the range of this parameter in the training set. This means that the models are suitable, especially for fat prediction which is the most relevant parameter either in breeding programs or quality control in the meat industry.

New 514 *longissimus dorsi* samples were predicted using the models. The corresponding GH and NH values are shown in Figure 1. It was observed that these new unknown samples were not well represented in the population used for calibration, with average values of 1.60 for GH and 1.21 for NH. Moreover, Figure 1 shows that three samples had GH values above 3, while 78.59 % of the 514 unknown samples had NH values above the limit (1.0), indicating little similarity to the training samples. These results were unexpected since there was a sample preparation protocol for the analysis of samples, the type of animals analysed in the different years was similar and the instrument diagnosis informed that the Foss NIRSystem was working properly.

At this stage, a critical step is to choose which, and how many, samples have to be sent to the laboratory for wet chemistry analysis to check the real performance of the models. Accordingly, the GH statistic was used to detect new spectral variability, and the NH statistic in conjunction with the initial NIR prediction for each constituent, to detect new chemically-interesting samples for analysis by wet chemistry, as well as to ensure a uniform range for each parameter in spectral libraries. The range, mean and standard deviation of the training set provide an overview of the structure of the samples used in the model; however, they provide no information on sample distribution or, therefore, on possible gaps in reference values in the training set. Sample distribution (set A) for each parameter in terms of reference data was analysed and the NIRS predictions of the unknown samples were plotted to check for useful samples to fill gaps. Thirty two samples collected in 2009 were selected to update the models, comprising samples deemed spectral outliers (3 samples with high GH) and samples with both a high NH (>1.0) and a prediction value for one or more parameters that was not well represented in the models (29 samples: 5 samples with extreme NH value; 7 samples to fill gaps with large NH for fat, 7 samples for moisture and 7 for protein). Table 1 shows the reference statistics of this set. It is observed compared to the initial structure of the training library that real extreme samples were selected for fat and moisture. The standard deviation values indicated large variability of the selected samples for these parameters. Mean values were higher for fat and lower for moisture compared to the training set. The larger difference was observed for the moisture parameter what can indicate that is a relevant factor which can be involved in the unexpected performance of the models during routine analysis.. Also, to check if the selected samples were really samples of interest to send to the lab the standard error of prediction (SEP) was calculated with the initial models. SEP was 0.82 % for fat, 1.89 % for moisture and 0.85 % for protein, which were large compared to the SECV of the initial models.

A new training set of 348 samples (set A+ = 316 samples of set A plus 32 samples from set B) was subjected to the process of developing calibration models. The updated calibration models displayed R^2_{CV} above 0.9 and SECVs values of 0.35 %, 0.46 % and 0.52 % for fat, moisture and protein, respectively (Table 2, set A+), similar to those of the original calibration. There was no improvement in model performance. The standard error of difference (SED) within the predictions for set B (minus the 32 samples included in the training set) obtained using the initial models developed with set A (Table 2; set A) versus the recalibrated models (Table 2; set A+) were: 0.15 % for fat, 0.11 % for moisture and 0.28 % for protein. However, the recalibrated models showed an improvement in GH and NH statistics; the initial models yielded an average GH = 1.60 and NH = 1.21 when set B (minus the 32 samples included in the training set) was evaluated and the recalibrated models yielded an average GH = 0.75 and NH = 0.41. Comparison of GH and NH distribution for the initial models (Figure 2) and for the updated models (Figure 3) showed that only

0.2% of the unknown samples evaluated in routine had NH values above the established limit. Thus, predicted values were more reliable using the recalibrated models, which enabled the detection of real spectral or chemical outliers. This was a very positive finding, given the time and cost involved in analysing meat samples by traditional wet chemistry.

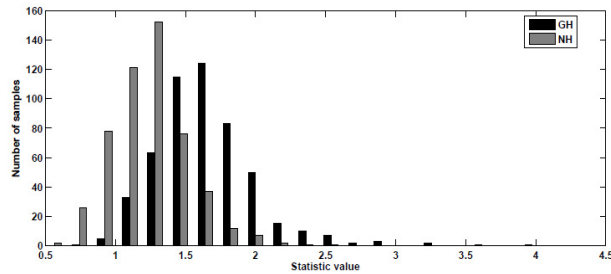


Figure 1. Frequency histogram of GH and NH values of set B (514 samples) predicted with initial models (Table 2; set A).

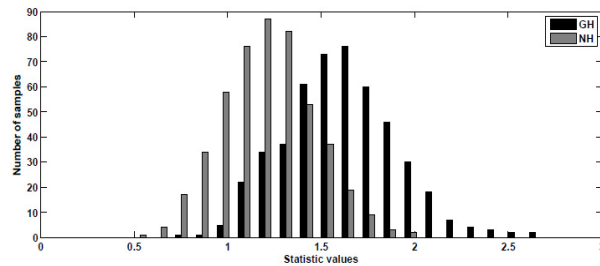


Figure 2. Frequency histogram of GH and NH values of set B minus 32 recalibration samples (482 samples) predicted with initial models (Table 2; set A).

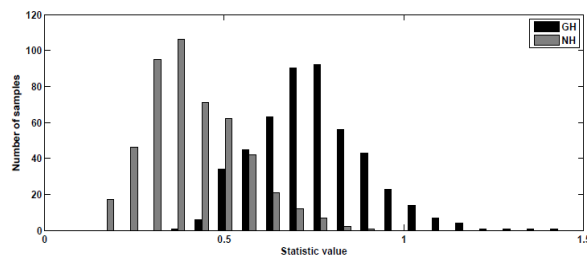


Figure 3. Frequency histogram of GH and NH values of set B minus 32 recalibration samples (482 samples) predicted with recalibrated models (Table 2; set A+).

Table 1. Descriptive statistics for training and recalibration sets (values expressed as % of wet weight).

Parameter	Training set (310 samples)				Recalibration set (32 samples)			
	Min	Max	Mean	SD	Min	Max	Mean	SD
<i>Fat (%)</i>	2.10	21.90	6.87	3.23	2.05	16.20	8.40	4.90
<i>Moisture (%)</i>	56.00	77.00	70.48	2.97	51.40	72.70	67.33	4.50
<i>Protein (%)</i>	16.80	26.20	21.45	1.65	18.90	24.10	22.10	1.47

Min: minimum; Max: maximum, SD: standard deviation

Table 2. Statistics for chemometric models developed for fat, moisture and protein with the set A (310 samples) and set A+ (342 samples = set A + recalibrated samples).

Parameter	Set	Data preprocessing	No. samples	No. factors	SEC (%)	SECV (%)	R ² _{cv}	RPD _{cv}	GH*	NH*
<i>Fat</i>	A	SNV + DT (1,10,5,1)	279	7	0.33	0.36	0.98	9.19	1.60	1.21
	A+	SNV + DT (1,10,5,1)	308	6	0.34	0.35	0.99	10.02	0.75	0.41
<i>Moisture</i>	A	SNV + DT (2,5,5,1)	279	7	0.37	0.42	0.97	7.33	1.60	1.21
	A+	SNV + DT (1,10,5,1)	308	7	0.44	0.46	0.97	7.28	0.75	0.41
<i>Protein</i>	A	SNV + DT (1,10,5,1)	296	6	0.47	0.50	0.91	3.36	1.60	1.21
	A+	SNV + DT (1,10,5,1)	322	7	0.49	0.52	0.90	3.23	0.75	0.41

*Average value calculated with the 514 samples of set B for the models developed with set A and with 482 samples of set B for models developed with set A+.

Conclusion

The use and understanding of spectral and chemical distance statistics to ensure the reliability/suitability of the NIR spectroscopy predicted values is critical in meat routine analysis. The methodology proposed ensures reliable predictions, saving time and money for recalibration, although the accuracy of the models does not change in terms of cross-validation errors. NIR spectroscopy is suitable for routine analysis of chemical composition of a large

number of Iberian pig meat samples, by using well structured spectral libraries and regular testing of equation performance.

Acknowledgments

This work was financed by the Research Project INIA “FIT 2006-060000”, Research Excellence Program of the Andalusian Regional Government (Project nº P09-AGR-5129) and co-financed by ERDF funds (1FD1997-1252-CO-02 and IFD1997-0990). The authors are grateful to the Iberian pig producers AECERIBER, COVAP S.C.A. and S.A.T. Vallehermoso for providing the experimental materials. Thanks are also given to technical staff of the Animal Production Department. EZR acknowledges the financial support of the Spanish Ministry of Education (FPU grant: AP2008-00838).

References

1. N. Prieto, R. Roehe, P. Lavín, G. Batten & S. Andrés, Application of near infrared reflectance spectroscopy to predict meat and meat products quality: A review. *Meat Science*, **83**, 175-186 (2009).
2. G. Tøgersen, T. Isaksson, B.N. Nilsen, E.A. Bakker & K.I. Hildrum. On-line NIR analysis of fat, water and protein in industrial scale ground meat batches. *Meat Science*, **51**, 97-102 (1999).
3. M. Prevolnik, M. Candek-Potokar & D. Skorjanc. Ability of NIR spectroscopy to predict meat chemical composition and quality - a review. *Czech Journal of Animal Science*, **49** (11), 500-510 (2004).
4. H. Huang, H. Yu, H. Xu & Y. Ying. Near Infrared spectroscopy for on/in-line monitoring of quality in foods and beverages: a review. *Journal of Food Engineering*, **87**, 303-313 (2008).
5. J.S. Shenk & M.O. Westerhaus. Calibration the ISI way. In A.M.C. Davies & P.C. Williams (Eds.). *Near Infrared Spectroscopy: The Future Waves*. (pp. 198-202). NIR Publications. Chichester. U.K. (1996).
6. R.J. Barnes, M.S. Dhanoa & S.J. Lister. Standard normal variate transformation and detrending of near infrared diffuse reflectance spectra. *Applied Spectroscopy*, **43**, 772-777 (1989).
7. J.S. Shenk & M.O. Westerhaus. Population structuring of near infrared spectra and modified partial least squares regression. *Crop Science*, **31**, 1548-1555 (1991).
8. M. Howard & Y. Workman, Statistics in Spectroscopy. Academic Press, Inc. N.Y. (1991).
9. P.C. Williams & D. Sobering, How do we do it: a brief summary of the methods we use in developing near infrared calibrations. In A.M.C.

Davies & P.C. Williams (Eds.). *Near Infrared Spectroscopy: The Future Waves*. (pp. 185-188) NIR Publications. Chichester. U.K. (1996).

15th International Conference of Near Infrared Spectroscopy (Ciudad del Cabo, Sudáfrica)



MONTE CARLO SIMULATION OF THE SOURCE-DETECTOR DISTANCE EFFECT ON NIRS MEASUREMENTS OF SUBCUTANEOUS ADIPOSE TISSUE IN PIG CARCASSES



E. Zamora-Rojas^{1,*}, A. Garrido-Varo¹, J.E. Guerrero-Ginel¹, E. De Pedro-Sanz¹, D.C. Pérez-Marin¹ and Y. Yamada²

¹Department of Animal Production, Faculty of Agricultural and Forestry Engineering, University of Córdoba, 14071, Córdoba, Spain.

²Department of Mechanical Engineering and Intelligent Systems, University of Electro-Communications, Chofu, Tokyo, 182-8585, Japan.
*e-mail: g32zaroe@uco.es

INTRODUCTION

- > In-situ analysis over the skin is crucial for on-field/on-line implementation in the meat industry due to the easy and fast way of spectra collection.
- > Predictive NIRS models developed with measurements performed over skin for the quantitative prediction of fatty acids are less accurate than those models developed with intact subcutaneous adipose tissue or melted fat (Pérez-Marin et al., 2009).
- > Source-detector distance can significantly affect the sampling region and the light penetration path. An optimum source-detector distance can maximize the signal sensitivity to the hypodermis.
- > Understanding the light-tissue interaction is, therefore, relevant for fine-tuning of existing commercial instruments, development of new ones and for obtain better measurements.

OBJECTIVE

To simulate the relationship between the light penetration depth and source-detector distance on the NIRS measurements of subcutaneous adipose tissue through pig skin by numerical simulation.

MATERIALS AND METHODS

- > A Monte Carlo method was used for simulation of light penetration depth depending on the source-detector distance.
- > Input parameters: refractive index (Ding et al., 2005), optical properties (Du et al., 2001; Cain et al., 2004 and Bashkatov et al., 2005), thickness of each layer (Renaudeau et al., 2006).
- > Wavelength range studied was from 1000nm to 1600nm based on the above data.
- > Optical arrangement assumed is shown in Figure 1. (source and detector are arranged concentrically with the source in the core and detector at the annulus).
- > Detector area detects only the photons whose incidence angle are lower than 11.5 degree, corresponding to the optical fiber's numerical aperture of 0.2.
- > Different diameters were varied in the simulation for estimating the measurement depth (175µm, 300µm or 400µm).
- > The source-detector distance was varied from 0.5mm to 5.5mm with a step of 0.5mm.

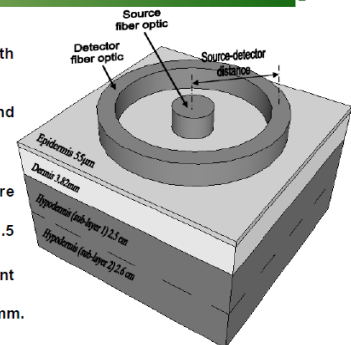


Figure 1. Schematic diagram of the cross section of pig skin tissue and fiber optic configuration.

RESULTS

1200nm is a fat-related absorbance band that is relevant to get fat information such as fatty acid profile. In this study the configuration simulated was optimized to this wavelength and then it was studied for the chosen instrument design the rest of wavelengths.

The results show that a fiber optic with a diameter of 400µm and a source-detector distance within them of 4.8mm can maximize the sensitivity of the measurements to the adipose tissue layer (target layer) in the 1200nm range (Figure 2).

Figure 3a shows the simulated percentage of absorbed photons for the above instrument configuration at the target layer. A weak signal can be detected since the numbers of photons from this layers is not larger than 10%. Moreover, NIR light is almost absorbed in the 1400-1600nm probably by the water of the epidermis and dermis layer.

The average depth of penetration of the NIR light in the selected wavelengths also indicates the predominance of the epidermis and dermis absorption (Figure 3b).

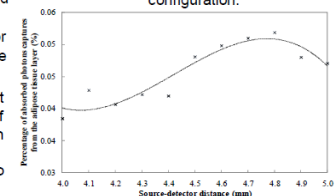


Figure 2. Percentage of absorbed photons captured by the detector with a 400µm diameter from the adipose tissue layer at 1200nm.

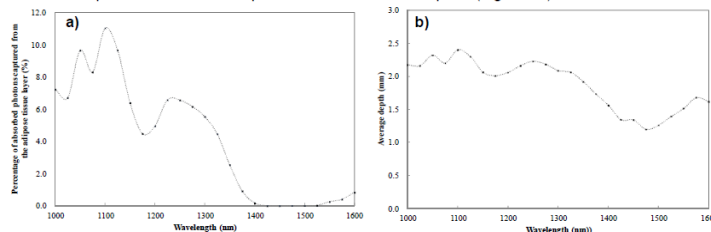


Figure 3. Absorbed photons percentage captured by a fiber optic of 400µm and a source-detector distance of 4.8mm from the adipose tissue layer (a) and average depth simulated (b).

FUTURE DIRECTIONS

The study of the optical properties of pig epidermis, dermis and subcutaneous adipose tissue from 600 to 1900nm is an important issue to improve the optimal source-detector distance selection due to the few references on this topic and with common wavelength data.

To verify the simulation results presented in this study, an experiment for measuring fat content through pig skin based on the instrumental performance simulated is in progress.

EZR acknowledges financial support for the research stay in Japan from the Spanish Ministry of Education as a fellow of the Program "Training of University Teachers (Formación del Profesorado Universitario) AP2008-00838. This work was financed by Research Excellence Program of the Andalusian Regional Government (P09-AGR-5129).

15th International Conference of Near Infrared Spectroscopy (Ciudad del Cabo, Sudáfrica)



SIMULATION STUDY OF THE QUANTITATIVE PREDICTION OF OLEIC ACID CONCENTRATION BY NIR SPECTROSCOPY IN PIG CARCASSES

E. Zamora-Rojas¹, A. Garrido-Varo¹, J.E. Guerrero-Ginel¹, E. De Pedro-Sanz¹, D.C. Pérez-Marín¹ and Y. Yamada²

¹Department of Animal Production, Faculty of Agricultural and Forestry Engineering, University of Córdoba, 14071, Córdoba, Spain.

²Department of Mechanical Engineering and Intelligent Systems, University of Electro-Communications, Chofu, Tokyo, 182-8585, Japan.

*e-mail: g32zaroe@uco.es



15th International Conference on Near Infrared Spectroscopy

INTRODUCTION

- > In-situ analysis over the skin is crucial for on-field/on-line implementation in the meat industry due to the easy and fast way of spectra collection.
- > Previous measurements done in our lab have demonstrated the ability of NIRS to predict quantitatively fatty acids profile in pigs, although showing lower accuracy compared to intact subcutaneous adipose tissue analysis and, moreover, versus melted fat (Pérez-Marín et al., 2009). This is partly due to the fact that the light has to travel through the skin and, therefore, this influences the measurements.
- > Knowing if the measurements through the skin can be sensitive to changes in the fatty acid profile in the hypodermis, it can help to better understanding of the light-tissue interaction and the accuracy of the models.

OBJECTIVE

To investigate the changes in the NIR spectra due to changes in the oleic acid (OA) concentration in the hypodermis, simulating measurements through the pig skin and predicting OA concentration by applying multivariate analyses.

MATERIALS AND METHODS

- > A Monte Carlo method was used for simulation of absorbance spectra through pig skin.
- > Input parameters: refractive index (Ding et al., 2005), optical properties (Du et al., 2001; Cain et al., 2004 and Bashkatov et al., 2005), thickness of each layer (Renaudeaud et al., 2006).
- > The effect of different oleic acid concentrations was only estimated on the absorption coefficient (μ_a) for the hypodermis, since it was assumed that the size, shape and refractive index of the scattering particles do not change. Values of μ_a from 0 to 2 cm^{-1} were changed in the hypodermis to simulate the changes in the reflectance spectra.
- > Based on the reported μ_a for 50% oleic acid in pig fat by Tsai et al. (2001) in the range 1100-1300nm, it was calculated the μ_a for the different oleic acid concentrations (range 30-70% OA). Then, by regression each μ_a value was correlated to its simulated absorbance and the spectra were estimated.
- > The differences found in the absorbance spectra were transferred to real pig skin spectra measured on a Foss NIRSystem spectrometer. Modified PLS (MPLS) regression was tested for the prediction of OA.

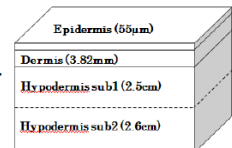


Figure 1. Pig skin diagram

RESULTS

Figure 2 shows the simulated changes in absorbance ($\log(1/\text{reflectance})$) at the wavelength of 1200nm for different μ_a values, which is fat related peak. Larger is the absorption coefficient; larger is the absorbance with a slightly stable tendency for values above 1cm^{-1} . This tendency was observed at other wavelengths. These simulated absorbance values were used for estimating the spectra at different OA percentages following the method explained above.

Figure 3 shows the simulated results of reflectance spectra for different concentrations of oleic acid in pig hypodermis for NIR measurements over the skin. The absorbance increases in all the wavelengths with the increase in oleic acid concentration. It seems that the changes may be extremely small to be accurately predicted by multivariate analysis methods. Clear differences were observed within simulated and real pig skin spectra due to the simplifications considered.

Figure 4 shows the spectra of real pig skin with the oleic acid concentration effects on the spectra added. This was performed adding to the average real pig spectra the differences simulated for each OA concentration.

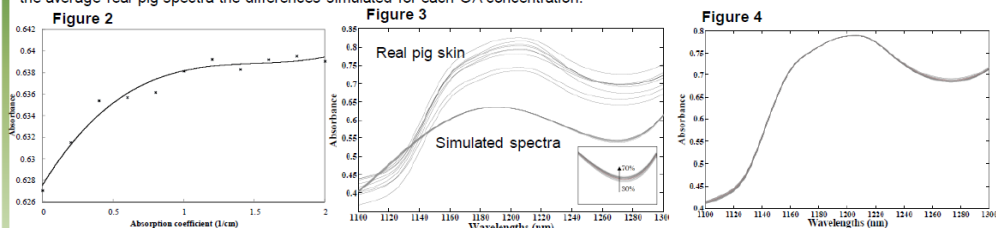


Table 1. PLS models for the prediction of oleic acid concentration with simulated spectra and real spectra.

Data	SEC (%)	SECV (%)	R ²
Simulated spectra	0.77	0.89	0.99
Real spectra with the simulated changes in the spectra	0.96	1.06	0.99

21 samples with a SNV+DT pre-treatment and second derivative (2,5,5,1)

MPLS regression indicates the possibility of predicting different OA concentrations for NIRS measurements performed over skin in pig carcasses.

CONCLUSIONS

This demonstrates mathematically-theoretically the possibility of detecting by NIRS different oleic acid concentrations in the subcutaneous adipose tissue in pigs and develop quantitative models for their prediction considering measurements over pig skin.

EZR acknowledges financial support for the research stay in Japan from the Spanish Ministry of Education as a fellow of the Program "Training of University Teachers (Formación del Profesorado Universitario) AP2008-00838. This work was financed by Research Excellence Program of the Andalusian Regional Government (P08-AGR-5129).

Evaluation of a handheld near infrared (NIR) spectrometer for the discrimination of Iberian pigs according to their feeding regime

E. Zamora-Rojas ¹, A. Garrido-Varo, E. De Pedro-Sanz, J.E. Guerrero-Ginel and D.C. Pérez-Marín

Department of Animal Production, Faculty of Agricultural and Forestry Engineering
University of Córdoba, Córdoba (Spain)
1e-mail: g32zaroe@uco.es

Abstract. The aim of this study was to evaluate a handheld near infrared spectroscopy (NIRS) instrument to classify Iberian pig carcasses in different commercial categories for instantaneous quality control and authentication in the industry. Sixty intact subcutaneous adipose tissue samples taken from the tail insertion area in the coxal region of the body were analyzed, twenty per category ("Bellota", "Recebo" and "Cebo"). A discriminant analysis based on the algorithm PLS2 was performed and different spectra pretreatment were evaluated. A Principal Component Analysis (PCA) showed more clear differences between "Cebo" samples and the other classes, while "Bellota" and "Recebo" were spectrally more similar within them. The external validation of the classification models based on a second derivative showed only one "Recebo" sample misclassified as "Bellota". These results show the high potential of the handheld NIRS device evaluated for the individual authentication of Iberian pig carcasses to discriminate the different feeding regime followed by the animal during the growing-finishing period.

Keywords. Iberian pigs - NIR Spectroscopy - Classification - MEMS spectrometer - Adipose tissue.

Évaluation d'un spectromètre portatif dans le proche infrarouge (NIR) pour la discrimination des porcs Ibériques se/on leur régime

Résumé. L'objectif de cette étude était d'évaluer un instrument portatif de spectroscopie dans le proche infrarouge (NIRS) pour classer les carcasses de porcs Ibériques selon les différentes catégories commerciales pour le contrôle de la qualité instantanée et de l'authentification dans l'industrie. Soixante échantillons de tissu adipeux sous-cutané intact prélevés dans la zone d'insertion de la queue dans la région coxa/e du corps ont été analysés, vingt par catégorie ("Bellota", "Recebo" et "Cebo"). Une analyse discriminante basée sur l'algorithme de PLS2 a été réalisée et les différents spectres de prétraitement ont été évalués. Une analyse en composantes principales (PCA) a montré plus de différences e/aires entre les aliments des échantillons "Cebo" et les autres classes, tandis que "Bellota" (gland) et "Recebo", spectralement, étaient plus semblables en leur sein. La validation externe des modèles de e/assification basés sur une dérivée seconde montre un seul échantillon "Recebo" classé à tort comme "Bellota". Les résultats montrent le potentiel élevé de l'appareil de poche NIRS évalué pour l'authentification individuelle des carcasses de porcs Ibériques, afin de discriminer les différents régimes d'alimentation suivis par les animaux pendant la période d'engraissement.

Mots-c/és. Porcs Ibériques - Spectroscopie NIR - Classement - Spectromètre MEMS - Tissu adipeux.

I – Introduction

The feeding regime of the animals during the final period of growing plays an important role in Iberian pig products quality (Garrido and De Pedro, 2007), within other factors that also influence such as the genotype (Ramírez and Cava, 2007), age or rearing conditions (Bonneau and Lebret, 2010). Those factors have a significant impact on the fatty acid composition and

mainly in the high unsaturated/saturated fatty acid ratio which at the end is responsible of the exceptional organoleptic and healthy properties of the Iberian meat products (Cava *et al.*, 2000; Ventana *et al.*, 2007). The Spanish legislation classifies the animals into four commercial categories depending on the feeding regime and production system (BOE, 2007): "Bellota" (i.e. animals in free range fed exclusively with grass and acorns), "Recebo" (i.e. animals fed with acorns and grass supplemented with compound feeds in a outdoor system), "Cebo" (i.e. animals fed with compound feed in an intensive system) and "Cebo de campo" (i.e. animals fed exclusively with compound feed in free range).

Official classification methods (on-farm inspections and gas chromatography of melted fat) are high cost and time-consuming, not providing individual items but batches information of animals groups that can have individual variability. Fast, accurate, objective, low cost and individual analysis methods are demanded by consumers and industry for quality control and authentication of these high market prices products. Since 1992, the potential of Near Infrared Spectroscopy (NIRS) has been highlighted for the analysis of melted fat (De Pedro *et al.*, 1992; García-Olmo *et al.*, 2009), intact adipose tissue (De Pedro *et al.*, 2007) and live Iberian pigs (Pérez-Marín *et al.*, 2009) as a tool for classifying Iberian pig animals into different commercial categories on the basis of the feeding regime. Few applications have been evaluated for on-line analysis (Pérez-Marín *et al.*, 2009) and nowadays there are appearing in the market new handheld devices of low cost and easy analysis presentation, providing instantaneous results readily-available. In this study is evaluated a handheld micro electron mechanical system (MEMS) NIRS spectrometer for classifying Iberian pigs carcasses according to their feeding regime.

11 - Materials and methods

1. Sample Set

Sixty Iberian pig adipose tissue samples were measured, taken from the tail insertion area in the coxal region of the body, where traditional gas chromatography biopsy is taken (De Pedro, 2001). The samples were stored at -20°C until 24 hours before the NIRS analysis. The sample set was composed of 20 samples of each commercial category studied ("Bellota", "Recebo" and "Cebo"). Animal feeding regime was controlled by trained personnel.

2. NIRS measurements

A handheld MEMS-NIRS instrument (Phazir 2400, Polychromix Inc., Wilmington, MA, USA) was used to collect reflectance spectra in the range 1600-2400 nm with a resolution of 8 nm (resolution-pixel 8nm, resolution-optical 12nm). A quartz protection was used for preventing dirt accumulation in the instrument. Three spectra per sample were collected and the mean spectrum per sample was used for further analysis.

3. Data modelling

As spectral pre-treatments, Standard Normal Variate (SNV) plus Detrending (DT) (Barnes *et al.*, 1989) was used to remove the multiplicative interferences of scatter and two derivative mathematical treatments were performed: window-wise filtering (1,10,5,1) and (2,5,5,1) (ISI, 2000). A Principal Component Analysis (PCA) was performed in order to detect spectral outlier samples and observe possible groups tendency. After outlier detection, the data set was divided in two: a training and validation (5 samples of each category) sets using the SELECT algorithm of the WinISI software. Discriminant analysis based on Partial Least-Squares (PLS2) was applied to classify the subcutaneous adipose tissue in the different commercial categories studied. The optimum number of model factors was selected by cross-validation using 4 groups. Those chemometric analyses were performed using the software WinISI 11ver 1.50 (Infrasoft International, Port Matilda, PA, USA). The classification models were statistically evaluated, by calculating the number of animals correctly classified.

III – Results

Figure 1 shows the mean spectra of each commercial category analyzed. It was observed a similar pattern for all the groups, although it seems that there is a difference in absorbance range. Fat peaks were recorded at around 1720-1760, 2150 and 2310-2340 nm (Williams and Norris, 1987; Osborne, Fearn and Hindle, 1993); characteristic absorption bands at around 1940 nm were water-related (Williams and Norris, 1987; Osborne, Fearn and Hindle, 1993).

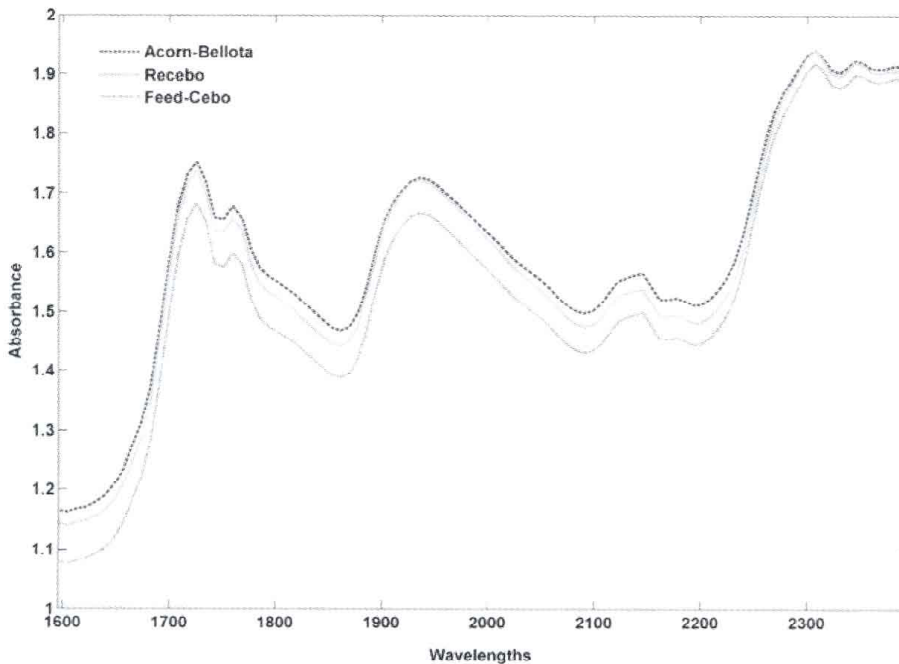


Fig. 1. Raw spectra (mean spectra) for each Iberian pig category studies.

PCA was performed to visualize the main structure of the data set and detect spectral outlier samples. It was observed 7 samples far from the centre of the population or with possible classification error due to the individual variability of the animals. After being removed, a new PCA analysis was performed using 9 Principal Components (PCs) explaining the 98.86%. The score plot (Fig. 2) shows clear differences between “Cebo” cluster and the other categories. “Recebo” and “Bellota” showed an overlap cluster, probably due to they are samples with a fatty acid profile more similar since those animals have eaten both acorns and grass.

Table 1 shows the statistics and number of samples correctly-classified of the training set, after outlier detection, for PLS discriminant. Two spectra pre-treatments were evaluated and a second derivative provided better classification results. A 91.66% of the “Bellota” samples were correctly classified, 63.6% of the “Recebo” samples and 100% of the “Cebo” samples. Table 2 shows the external validation of the model performed with a second derivative. Only one sample of the “Recebo” group was misclassified as an “Bellota” sample.

It should be remarked that any sample of the group “Cebo” (products with lower prices) was misclassified in the other groups (“Bellota” or “Recebo”, products with higher prices) or vice versa. These results confirm the possibility to discriminate Iberian pig adipose tissue from animals reared under different feeding regime using a handheld MEMS-NIRS instrument that can be implemented in on-line applications in the industry.

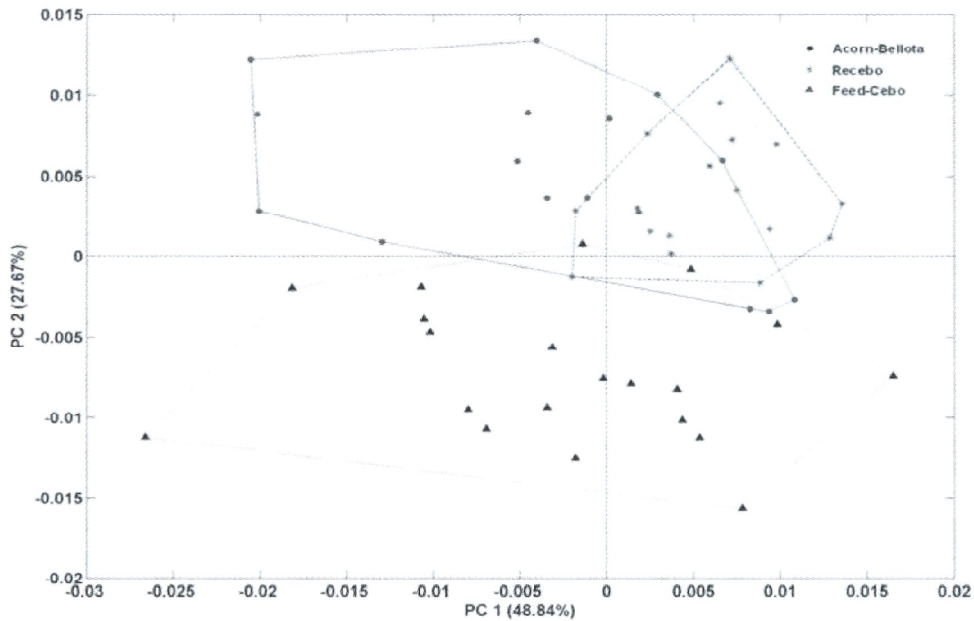


Fig. 2. PCA score plots for the two principal components.

Table 1. Classification results obtained by the PLS discriminant with a second derivative

Origin	No. of samples	Classified as		
		Bellota	Recebo	Cebo
Bellota	12	11	1	0
Recebo	11	4	7	0
Cebo	15	0	0	15

Table 2. External validation of the second derivative PLS discriminant model

Origin	No. of samples	Classified as		
		Bellota	Recebo	Cebo
Bellota	5	5	0	0
Recebo	5	1	4	0
Cebo	5	0	0	5

IV - Conclusions

The classification of Iberian pig intact adipose tissues using the handheld NIRS device evaluated was successful. PLS discriminant performed better classification predictions with a second derivative with only one sample of the "Recebo" group misclassified for the external

validation. These results indicate the feasibility of performing an individual authentication of Iberian pig carcasses according to the feeding regime of the animals in a fast and with possibility of on-line applications. Further work is required in order to develop robust classification models with larger data sets and transfer the technology from laboratory to an on-line monitoring system.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the financial support provided by the INIA (Project number: RTA08-36) and the research projects of the Andalusian Regional Government AGR-285 and AGR-5129. EZR acknowledges financial support from the Spanish Ministry of Education as a fellow of the Program "Training of University Teachers" (Formación del Profesorado Universitario, FPU).

References

- Barnes, R.J., Ohanoa, M.S. and Lister, S.J. 1989. Standard normal variate transformation and detrending of near infrared diffuse reflectance spectra. In *Applied Spectroscopy*, 43: 772-777.
- BOE, 2007. Real Decreto 1469/2007
- Bonneau M., and Lebret B. 2010. Production systems and influence on eating quality of pork. In *Meat Science*, 84: 293-300.
- Cava R., Ventanas J., Ruiz J., Andrés A.I. and Antequera T. 2000. Sensory characteristics of Iberian ham: Influence of rearing system and muscle location. In *Food Science Technology International*, 6: 235-242
- De Pedro E. 2001. Calidad de las canales y de los productos del cerdo Ibérico: técnicas de control y criterios de calidad. In: *Porcino Ibérico, aspectos claves*, Ed by C. Buzadé, Mundiprensa, Madrid, pp. 589-621
- De Pedro E., Garrido A., Bares I., Casillas M. and Murray 1. 1992. Application of near infrared spectroscopy for quality control of Iberian pork industry. In *Near infrared spectroscopy bridging the gap between data analysis and NIR applications* (pp. 345-348). K.I. Hildrum, R. Isaksson, T. Naes and A. Tandberg (Eds.). UK: Ellis Horwood.
- De Pedro E., Nuñez N., García J., Aparicio D., Campos M.I. and Pérez M.O. 2007. Implementing near infrared spectroscopy in the Iberian pig industry. In *Options Méditerranéennes* 76: 225-228.
- García-Olmo J., Garrido-Varo A. and De Pedro E. 2009. Classification of real farm conditions Iberian pigs according to the feeding regime with multivariate models developed by using fatty acids composition or NIR spectral data. In *Grasas y aceites* 60 (3): 233-237.
- Garrido A. and De Pedro E. 2007. The role of near infrared spectroscopy in verifying label information in agro-forestry. In: *Handbook of near-infrared spectroscopy analysis. Practical spectroscopy series*, Ed by O.A. Burns and E.W. Ciurczak, CRC Press, USA, pp. 387-398
- ISI, 2000. The complete software solution using a single screen for routine analysis, robust calibrations and networking. Infracsoft International Sylver Spring MO, USA.
- Osborne B.G., Fearn T. and Hindle P.H. 1993. Practical NIR spectroscopy with applications in food and beverage analysis. In *Food and Beverage Analysis*. (pp.11-35). B.G. Osborne, T. Fearn and P.H. Hindle (Eds.). Longman, Essex.
- Pérez-Marín D., De Pedro E., Guerrero-Ginel J.E. and Garrido-Varo A. 2009. A feasibility study on the use of near-infrared spectroscopy for prediction of the fatty acid profile in live Iberian pigs and carcasses. In *Meat Science* 83,627-633
- Ramírez R. and Cava R. 2007. Carcass composition and meat quality of three different Iberian-Ouroc genotype pigs. In *Meat Science* 75, 388-396
- Ventana S., Ruiz J., García C. and Ventana J. 2007. Preference and juiciness of Iberian dry-cured loin as affected by intramuscular fat content, crossbreeding and rearing system. In *Meat Science*, 77, 324-330.
- Williams P.C. and Norris K.H. (Eds.). 1987. *Near-infrared technology in the agricultural and food industries*. 8t. Paul, MN: American Association of Cereal Chemists.

VII International Symposium on the Mediterranean Pig. (Córdoba, España)



NON-DESTRUCTIVE ANALYSIS OF FRESH IBERIAN PORK LOINS BY NEAR INFRARED SPECTROSCOPY

E. Zamora-Rojas, A. Garrido-Varo, D.C. Pérez-Marín, J.E. Guerrero-Ginel and E. De Pedro-Sanz

Department of Animal Production, Faculty of Agricultural and Forestry Engineering, University of Córdoba, 14071, Córdoba, Spain

*e-mail: g32zaroe@uco.es



INTRODUCTION

Iberian pig products have high rate consumer acceptance based on their organoleptic, healthy and sensory characteristics. However, guarantee a target product over time is a complex task due to the heterogeneity of the meat fresh.

For preparing good mixture to produce dry-cured or processed products
For labeling purposes

Meat industry requires control procedures

Traditional wet chemistry

Near Infrared Spectroscopy

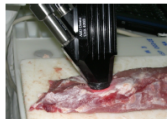
Costly
Destructive
Tedious
Time-consuming
Low operating costs
Fast
Non-destructive (on-line)
Multi-parameter

OBJECTIVE

Evaluate a fiber-optic contact probe NIRS instrument to predict chemical composition (fat, moisture and protein) of intact Iberian pork loins

MATERIALS AND METHODS

- 173 Iberian pig loins
- Two instrumental and sample presentation analysis



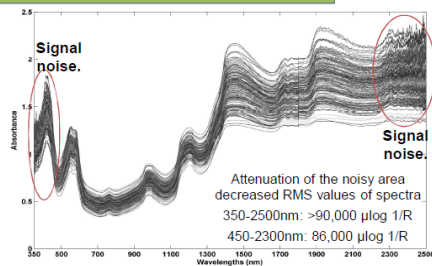
LabSpec®Pro A108310 (Analytical Spectral Device-ASD)
350-2500nm (1nm spectral resolution)
Intact loins at the slaughter house



FossNIRSystem 6500 with spinning module for standard circular cups
400-2500nm (2nm spectral resolution)
Ground loins at the laboratory

- Chemometrics calculations performed with WinISI ver 1.5 (Infrasoft International, Port Matilda, PA, USA)
- Modified Partial Least Squared (MPLS) regression was used to develop prediction models for fat, moisture and protein.
- Standard Normal Variate and Detrending plus first (1,10,5,1) and second derivative (2,5,5,1) as spectral pretreatments.

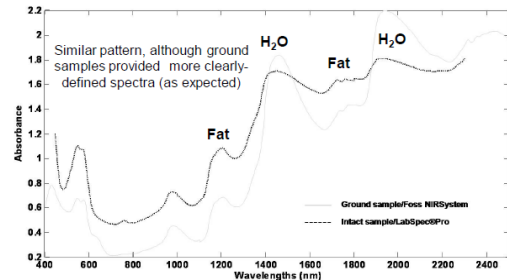
RESULTS



Ground spectra were used to predict fat, moisture and protein composition of the Iberian pork loins with a robust model developed for the FossNIRSystem working in the 1100-2500nm range (not published) over different years and with different ground pork muscles in our research group. The prediction obtained for each sample was used as reference value for developing calibration models for the intact loins using the fiber-optic instrument.

CONCLUSIONS

Promising results of the on-line NIRS instrument evaluated for the quantitative chemical composition prediction of intact Iberian pork loins. This enables instantaneous measurements with important industrial advantages in the process and quality control of Iberian pork meat.



Calibration statistics for the NIRS models developed for the remote fiber-optic probe using intact Iberian loin samples

Parameter	Range (nm)	Pre-treatment	N° samples	N° PCs	SEC (%)	r ²	SECV (%)
Fat	450-2300	1,10,5,1	173	4	1.42	0.68	1.65
Moisture	450-2300	2,5,5,1	168	4	0.83	0.59	1.25
Protein	450-2300	1,10,5,1	171	4	0.51	0.56	0.59

PC: principal component; SEC: standard error of calibration; SECV: standard error of cross-validation; r²: coefficient of determination for cross-validation.

This research formed part of the Research Projects "Determinaciones analíticas de muestras de carnes y grasas de razas porcinas autóctonas" financed by AECEBIBER. The authors acknowledge to the company Bonsai Advanced Technologies S.L. for providing the spectrometer EZR acknowledges financial support from the Spanish Ministry of Education as a fellow of the Program "Training of University Teachers" (Formación del Profesorado Universitario)

VII International Symposium on the Mediterranean Pig. (Córdoba, España)



NIRS SPECTRA REPEATABILITY OF INTACT VERSUS GROUND IBERIAN PORK LOINS

E. Zamora-Rojas, A. Garrido-Varo, D.C. Pérez-Marín, J.E. Guerrero-Ginel and E. De Pedro-Sanz

Department of Animal Production, Faculty of Agricultural and Forestry Engineering, University of Córdoba, 14014, Córdoba, Spain

*e-mail: g32zaroe@uco.es



INTRODUCTION

Traditional meat NIRS analysis uses grinded or minced samples. Sample preparation is a time-consuming task. New portable NIRS devices, able to be used for in-situ instantaneous analysis, are appearing in the market, opening opportunities for non-destructive NIRS analysis. However, Iberian pork meats are very heterogeneous making intact analysis difficult.

OBJECTIVE

Compare the repeatability of NIR spectra collected on intact and ground Iberian pork loins using a portable handheld spectrometer.

MATERIALS AND METHODS

- 58 Iberian pig loins. Two muscles per loin were analyzed: *M. longissimus dorsi* and *M. spinalis dorsi*.
- Two sample presentation analysis:



- Handheld MEMS digital transform spectrophotometer (Phazir, Polychromix Inc.) working from 1600-2400nm (spectral resolution ~8nm).
- Spectral repeatability was evaluated with the statistic Root Mean Square (RMS) of four replicates spectra obtained for each sample of muscle type.

$$Mean_RMS = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (RMS_i)^2}{N}}; Mean_STD = Mean_RMS \times \sqrt{\frac{N}{N-1}}; RMS_{lim} = 1.036 \times Mean_STD; N = n^{\circ} replicates$$

RESULTS

Longissimus dorsi shows better repeatability for both sample presentations than *spinalis dorsi*. Comparing sample presentation, both muscles show that intact samples had lower repeatability than ground due to the clear evidence of the different fat distribution (Table 1).

The definition of a RMS limit can be useful for the detection of spectral errors. Focus on the sample presentation, it can be considered a maximum RMS of 63,800 $\mu\log(1/R)$ for intact and 25,700 $\mu\log(1/R)$ for ground samples.

Figure 1 shows a similar pattern for both muscles and also comparing ground versus intact presentation, although in this case ground samples show better defined absorption peaks than intact samples.

Sampling is a complex task in intact samples since it is necessary to obtain a representative mean spectrum per sample. Figure 2 shows the intact sample heterogeneity. It can be observed samples with clear presence of fat peaks (due to the presence of fat in the tissue) or samples with not sharp fat peaks (due to lower marbling of the sample).

Table 1. Statistic values for each muscle and sample presentation.

Muscle	Mean RMS ($\mu\log(1/R)$)		Mean STD ($\mu\log(1/R)$)	
	Intact	Ground	Intact	Ground
<i>Longissimus</i>	51,160	19,640	59,100	22,680
<i>Spinalis</i>	69,990	21,435	80,810	24,750

CONCLUSIONS

The implementation of a NIRS sensor requires the fine-tuning of the sample analysis methodology. The use of the RMS statistic enables the control of the spectral repeatability, detection of spectral errors and optimization of the sampling.

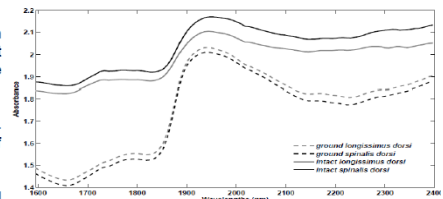


Figure 1. Mean NIR spectra of each muscle type and sample presentation.

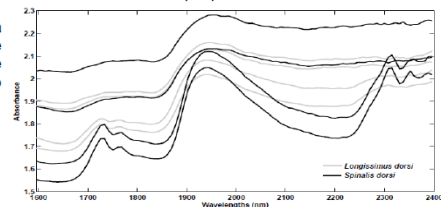
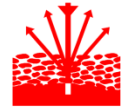


Figure 2. Four intact samples of each muscle type representing the heterogeneity within them.

This research formed part of the Research Project: INIA "FIT-2008-060000" and "Safety and traceability in the food chain using NIRS (AGR-285)". The authors are grateful to Iberian pig producer SAT Vallehermoso for providing the experimental material. EZR acknowledges financial support from the Spanish Ministry of Education as a fellow of the Program "Training of University Teachers" (Formación del Profesorado Universitario).

International Diffuse Reflectance Conference 2010 (Chambersburg, Estados Unidos)



INSTANTANEOUS IBERIAN PIG ADIPOSE TISSUE CLASSIFICATION:

A COMPARISON OF TWO SPECTRAL RANGES

E. Zamora-Rojas,* A. Garrido-Varo, E. De Pedro-Sanz, J.E. Guerrero-Ginel and D.C. Pérez-Marín

Department of Animal Production, Faculty of Agricultural and Forestry Engineering, University of Córdoba, 14014, Córdoba, Spain

*e-mail: g32zaroe@uco.es



INTRODUCTION

- According to the feeding regime of the animals, the Spanish legislation classified the Iberian pig meat products in different categories with different organoleptic and nutritional attributes and prices.
- Iberian pig industry requires objective and fast authentication systems for carcass quality control.
- The MEMS Phazir device has two spectral range available: 1000-1800 nm and 1600-2400 nm. Both instruments include important and, maybe, complementary information about fat and fatty acids absorption features. The two instruments differ in prices.

OBJECTIVE

Evaluate two NIR spectral regions for Iberian pig carcass classification according to the feeding regime of the animals with a MEMS-NIRS handheld spectrometer

MATERIALS AND METHODS

- 95 Iberian pig intact backfat samples. Stored at -20°C until 24 hours before the analysis (43 Recebo and 52 Feed-Cebo).
- Handheld MEMS digital transform spectrophotometer (Phazir, Polychromix Inc.). Two instrument with different spectral range:
 - Phazir-1018: 1000-1800 nm
 - Phazir-1624: 1600-2400 nm
- Standard Normal Variate (SNV) and Detrending (DT) plus derivative as spectral pretreatments.
- Chemometrics calculations performed with WinISI ver 1.5 (Infrasoft International, Port Matilda, PA, USA).
- Principal Component Analysis (PCA) to visualize the structure of the data set and detect outlier samples.
- Selection of a training and validation set using the CENTER algorithm by Shenk & Westerhaus, 1991.
- Discrimination models performed with PLS2 (WinISI ver 1.50).

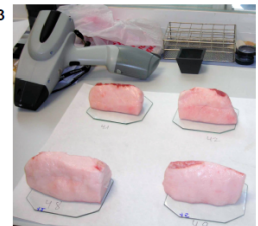


Figure 1. Iberian pig backfat samples.

RESULTS

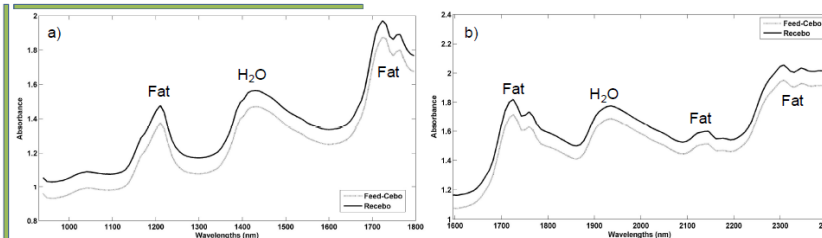


Figure 2. Mean spectra of each feeding regime category. a) 1000-1800 nm; b) 1600-2400 nm

Both spectral ranges show different absorption peaks related to fat, which it's influenced (quantitatively and qualitatively) by the feeding regime of the animals (Fig 2).

A PCA showed better defined groups within the two feeding regime categories when it was performed with the 1000-1800 nm range (not shown).

The best spectra pretreatment for each spectral range are shown in Table 1. Cross-validation and external validation showed a 100% correctly classified samples for the 1000-1800 nm range.

Table 1. PLS discriminant results.

	1000-1800nm		Classified as		1600-2400nm		Classified as			
	SNV + DT 2 nd derivative (2,5,5,1)	Number of training samples	Number of test samples	Recebo	Feed-Cebo	SNV + DT 1 st derivative (1,5,5,1)	Number of training samples	Number of test samples	Recebo	Feed-Cebo
Origin	Recebo	28	15	28(15)	0(0)	Recebo	28	15	27(15)	1(2)
	Feed-Cebo	37	15	0(0)	37(15)	Feed-Cebo	37	15	1(0)	36(13)

In brackets () corresponds to the external validation results

CONCLUSIONS

The selection of the optimal spectral range can optimize the accuracy of the models. The fat absorption peaks in the 1000-1800 nm range are more useful to discriminate within feeding regime. The MEMS-NIRS devices evaluated enables the on-line and on-site discrimination of individual Iberian pig backfat samples.

This research formed part of the Research Project: "Safety and traceability in the food chain using NIRS (AGR-285)". The authors are grateful to the Iberian pig industry COVAI S.C.A. and D.O.P. Los Pedroches for providing the experimental material. EZR acknowledges financial support from the Spanish Ministry of Education as a fellow of the Program "Training of University Teachers" (Formación del Profesorado Universitario) and to the CNIRS for the travel grant to assist to the Conference.

IV Conference NIR on the Go. (Padova, Italia)

NIR on the GO 2010
IV Conference

Title: Online Near Infrared Classification of Iberian Pigs Carcasses According to their Feeding Regime

E. Zamora-Rojas*, A. Garrido-Varo, E. De Pedro-Sanz, J.E. Guerrero-Ginel, D.C. Pérez-Marín
Department of Animal Production, University of Córdoba, Córdoba, 14014 Spain, e-mail: g32zaroe@uco.es

[Introduction] The quality, sensory characteristics and healthy properties of the Iberian pig products are highly related with the fatty acid profile of the meat and fat. The genotype, age, rearing conditions and mainly the feeding regime of the animals during the final period of growing influence in that quality. The Spanish legislation determines different commercial categories depending on genotype, production system and feeding regime. According to the feeding regime, there are three main categories: Acorn-Bellota, Recebo and Feed-Cebo which have some differences in their fatty acid composition. On-farm inspection and gas chromatography are officially used for classification purposes, however industry and consumers demand fast, accurate, objective and low cost authentication methods that informs individually of each animal. Near Infrared Spectroscopy (NIRS) has shown its viability to be a suitable at-line tool for this purpose. The aim of this work was to evaluate the performance and accuracy of a handheld NIRS instrument to classify Iberian pig carcasses according to the feeding regime of the animals during the final period of growing in an on-line application.

[Materials and Methods] One hundred and twenty five Iberian pig carcasses were used (41 of the category Acorn-Bellota, 34 of Recebo and 50 of Feed-Cebo). Reflectance spectra were taken with a handheld micro-electro-mechanical (MEMS) spectrometer (Phazir 2400, Polychromix Inc., Wilmington, MA, USA) from the subcutaneous adipose tissue located in the tail insertion area in the coxal region of the body directly from the carcasses two hours after the animals were slaughtered. The instrument measures from 1600-2400 nm. Chemometric calculations were carried out in WinISI ver 1.50 (Infrasoft International, Port Matilda, PA, USA). Principal Component Analysis (PCA) was used to visualize the structure of the data set, possible category cluster and outlier samples. The data set was divided in two: a training set (N=95) and a validation set (N=30, 10 samples per each category). These samples were selected using the SELECT algorithm by Shenk & Westerhaus included in the WinISI software. Discriminant analysis based on Partial Least Squares (PLS2) was used to develop the discrimination models. First (1,10,5,1) and second (2,5,5,1) derivative together with Standard Normal Variate (SNV) and Detrending (DT) was used as spectral pretreatments. Cross-validation with 4 groups was used to optimize the number of model factors.

[Results and Discussion] The spectra of the adipose tissues analyzed in the carcasses show a similar pattern independently of the animal category. It was observed different absorption peaks related to fat (1720-1760, 2150 and 2310-2340 nm) and water (1940 nm). The PCA score plot (10 PCs explaining the 99.09% of the variability for a second derivative) showed three different clusters, although there was slim overlapping between them (Figure 2). Table 1 shows the prediction results of the training set using PLS discriminant for a second derivative. A second derivative showed better classification results compared to a first derivative (not shown). The prediction as Acorn-Bellota category showed 96.77% of samples correctly classified, 97.5% for Feed-Cebo and 100% for Recebo. Table 2 shows the external validation of the above models. A second derivative provided larger number of samples correctly classified than a first derivative with only two samples misclassified of Feed-Cebo as Acorn-Bellota. These results indicate the viability of on-line authentication of Iberian pig carcasses at the slaughterhouse according to the feeding regime of the animals. However, models with highest number of samples are being developed. Furthermore, the handheld spectrometer needs further investigations to optimize its applicability and accuracy.



Figure 1. On-line measurement of Iberian pig carcasses

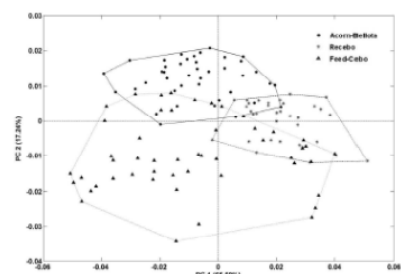


Figure 2. PCA score plot for the two first principal components (2nd derivative)

Non-destructive *in-vivo* classification of Iberian pigs measured with a hand-held nir digital transform spectrometer: a viability study

E. Zamora-Rojas*, A. Garrido-Varo, E. De Pedro, J.E. Guerrero-Ginel and D. Pérez-Marín

Department of Animal Production, Faculty of Agricultural and Forestry Engineering, University of Córdoba, Spain.

* Corresponding author: Tel. +34957218555; fax. +34957218555; e-mail: g32zaroe@uco.es; address: Campus Rabanales, N-IV, km 396, 14014, Córdoba, Spain.

Introduction

Iberian pig products are well known over the world for their exceptional organoleptic characteristics and healthy properties, and because they are produced in a sustainable and natural ecosystem, called *The Dehesa*. The genotype¹ and feeding regime² of the animals influence in the meat quality because they are directly related with the fatty acid profile and mainly with the high unsaturated/saturated fatty acid ratio. Furthermore, the marbling, oiliness, brightness, aroma and flavour are related with the fatty acid composition of the intramuscular fat.³ The Spanish legislation classifies the animals into four commercial categories, depending on the feeding regime during the final growing-finishing period and the system of production.⁴ In fact, a product of the highest quality category “*Acorns*” (i.e. animals in free range fed exclusively with natural resources in the Dehesa) costs approximately double that of a product of animals fed with compound feeds in an intensive system, “*Concentrates*”.

The official quality control systems for determining the feeding regime of the animals are based on on-farm inspection and fatty acid composition analysis of the subcutaneous fat by gas chromatography.⁴ However, these methods are expensive and time-consuming, and provide information only of batches of animals.⁵ Consumers are demanding objective authentication systems for these high market priced products. The industry requires new rapid screening techniques for individual certification of animals to enable payment to the livestock farmer for individual

animals of each commercial category, instead of paying by batches, that can have variability of the type of animals within each group.

Near Infrared (NIR) Spectroscopy has shown its potential for the authentication of Iberian pig products according to the feeding regime over the past 17 years. First attempts focused on the analysis of melted fat, and later on intact fat or adipose tissue². More recently a viability study has been carried out using a spectrometer provided with a fiber optic probe on carcasses and live animals in the slaughterhouse.⁵ However, handheld devices are appearing in the market during the past few years.

The aim of this work was to investigate the feasibility of using a handheld micro electron mechanical system (MEMS) NIR spectrometer for classifying live Iberian pigs according to their feeding regime.

Materials and methods

Animal set

Ninety-five Iberian pigs were measured before being slaughtered at commercial Spanish slaughterhouses. These animals belonged to two commercial categories concerning the feeding regime during the growing-finishing period: one group of 47 animals was designated “*Acorns*” and a group of 48 was designated “*Concentrates*”.

NIR spectroscopy measurements

The reflectance spectra of live animals were collected using a hand-held MEMS-NIRS instrument (Phazir 2400, Polychromix Inc., Wilmington, MA, USA). The instrument operates between 1600–2400 nm with 8 nm intervals (resolution-pixel 8 nm, resolution-optical 12 nm). A quartz protection was used for preventing dirt accumulation in the instrument.

Spectra measurements were taken from the tail insertion area in the coxal region of the body; the site used for the traditional gas chromatography based control procedure.⁶ Three spectra per animal were collected, and the mean spectra were used for model development.

Data treatment

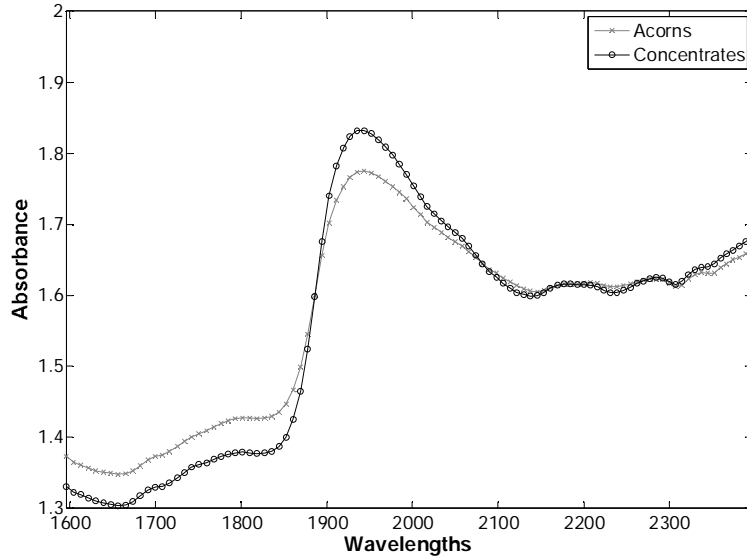
All the chemometric calculations were performed using MATLAB ver. 7.6 (The MathWorks, Natick, USA) and the PLS_toolbox (Eigenvector Research, Manson, USA).

Before averaging the spectra of each animal, the spectral repeatability was evaluated using the Root Mean Squared (RMS) statistic for removing spectra that clearly deviated from the median spectrum.

Multivariate analyses based on Partial Least-Squares Discriminant Analysis (PLS-DA)⁷ were applied to classify the animals analyzed in the different commercial categories studied. The optimum number of model factors was selected by leave-one-out cross-validation. Outlier detection was performed based on the Residuals (Q) and Hotelling (T^2) values for the detection of animals with atypical spectra.⁸

The classification models were statistically evaluated, by calculating the number of animals correctly classified.

(a)



(b)

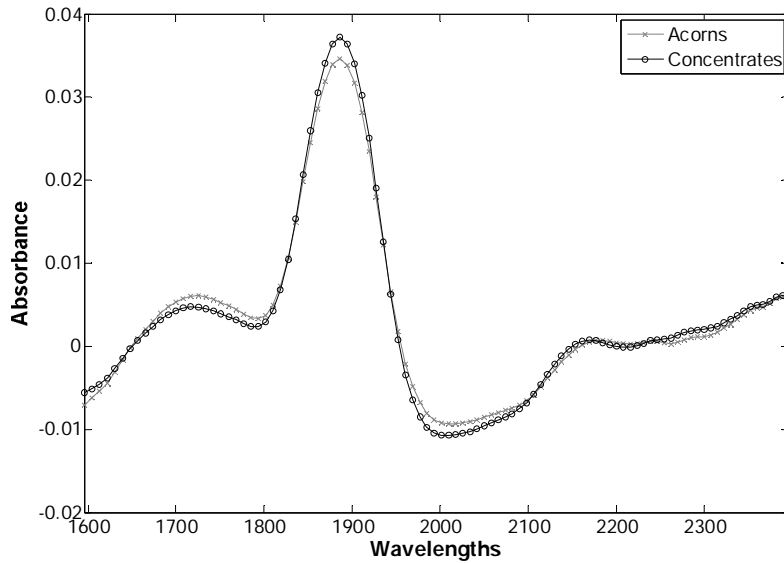


Figure 1. Mean spectra for each Iberian pig category. a) raw spectra; b) first derivative; c) second derivative

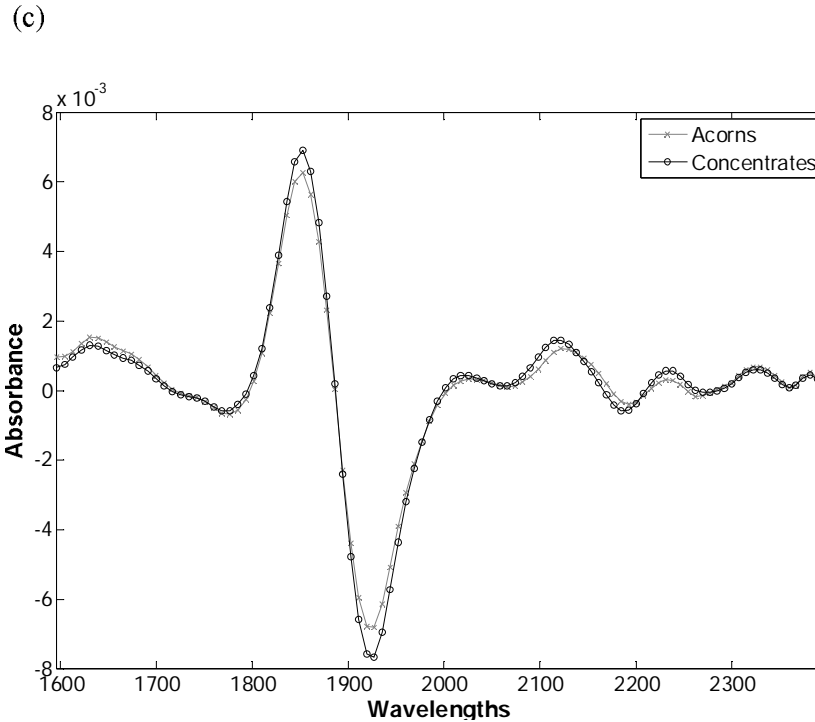


Figure 1. (continued)

Results and discussion

In order to reduce noise and baseline shifts that may be due to movement of the live animals during the measurements, or poor contact between the sample window and the animal, NIR spectra repeatability was calculated with the different replicate spectra of the same animal, for checking the quality of the spectra. Before averaging the replicate spectra taken from each animal body, RMS values exceeding $700,00 \mu\log 1/R$ were considered unacceptable. Once these scans were

Table 1. Classification results obtained by PLS-DA model and 1st derivative.

MSC/1 st der/Mean center $RMSEC=0.16\%$ $RMSECV=0.28\%$ $R^2=0.89$		Classified as	
		Acorns	Concentrates
Origin	Acorns	42 (41)	1 (2)
	Concentrates	0 (2)	45 (43)

In brackets () corresponds with the results for cross-validation.

Table 2. Classification results obtained by PLSDA model and 2nd derivative.

MSC/2 nd der/Mean center $RMSEC=0.20\%$ $RMSECV=0.27\%$ $R^2=0.83$		Classified as	
		Acorns	Concentrates
Origin	Acorns	42 (42)	1 (1)
	Concentrates	1 (2)	44 (43)

In brackets () corresponds with the results for cross-validation.

removed, the mean spectra of each animal were calculated, and different mathematical pretreatments were evaluated. Seven animals were detected as outliers, 4 of the category “*Acorns*” and 3 of the class “*Concentrates*”.

Figure 1 shows the average spectra of the each animal category after different mathematical pre-treatments.

An important absorbance region around 1900nm was observed, identified as area of water absorption that can be related with the presence of dampness on the animals’ skin. Small differences can be seen between the average spectra of each animal category around 2150–2300nm, which may be related with protein and/or fat [Figure 1(c)].

Tables 1 and 2 show the statistics and number of animals correctly-classified of the training set, 0 after outlier detection, for a first and second derivative respectively.

Both derivative pre-treatments provided similar classification results. A first derivative correctly classified 100% of the animals of the “*Concentrates*” category, while one animal of the category “*Acorns*” was incorrectly classified. The cross-validation results showed also a high percentage of animals correctly classified for both classes (95.55% for “*Concentrates*” and 95.34% for “*Acorns*”). Furthermore, the misclassified animals from the category “*Acorns*” as belonging to the class “*Concentrates*” could be explained by the fact that the animals hadn’t eaten enough natural resources from the Dehesa to obtain that category.

Conclusions

This viability study demonstrated the high potential of the handheld NIRS device evaluated for the individual monitoring of *in-vivo* Iberian pigs, to discriminate the different feeding regime followed by the animal during the growing-finishing period. Further work is required in order to study the effect of the presence of hair and skin in the NIRS measurements, to improve the spectra repeatability and to develop more robust discrimination models with larger number of animals.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the financial support provided by the Andalusian Regional Government with the research project AGR-285 and AGR-5129 and to the Iberian pig producers Señorío de Montanera, COVAP and Camilo Ríos S.L. for providing the experimental materials. EZR acknowledges financial support from the Spanish Ministry of Education as a fellow of the Program “Formación del Profesorado Universitario (FPU)”.

References

1. R. Ramírez and R. Cava, *Meat Sci.* **75**, 388-396 (2007).
2. A. Garrido and E. De Pedro, in *Handbook of near-infrared spectroscopy analysis. Practical spectroscopy series*, Ed by D.A: Burns And E.W. Ciurczak. CRC Press, Boca Raton, USA, pp. 387–398 (2007).
3. R. Cava, J. Ventanas, J. Ruiz, A.I. Andrés and T. Antequera, *Food Sci.e Technol. Int.* **6**, 235-242 (2000).
4. BOE, Real Decreto 1469/2007 (2007).
5. D. Pérez-Marín, E. De Pedro, J.E. Guerrero-Ginel and A. Garrido-Varo, *Meat Sci.* **83**, 627-633 (2009).
6. E. De Pedro, in *Porcino Ibérico, aspectos claves*, Ed by C. Buzadé, Mundiprensa, Madrid, Spain, pp. 589–621 (2001).
7. M. Barker and W. Rayens, *J. Chemometrics* **17**, 166-173 (2003).
8. M.S Larrechi and M.P. Callao, *Trends Anal. Chem.* **22**, 634-640 (2003).

14th International Conference of Near Infrared Spectroscopy. (Bangkok, Tailandia).



INFLUENCE OF THE INSTRUMENT SETTING PARAMETERS ON THE REPEATABILITY OF NIR SPECTRA OF INTACT PORK LOINS ANALYZED WITH A HANDHELD SPECTROMETER

E. Zamora-Rojas,¹ A. Garrido-Varo,¹ D.C. Pérez-Marín,¹ E. De Pedro-Sanz,¹ J.E. Guerrero-Ginel¹ and F.G. Haibach²

¹Department of Animal Production, Faculty of Agricultural and Forestry Engineering, University of Córdoba, 14071, Córdoba, Spain
²Polychromix, Inc. Wilmington, 01887, Massachusetts, USA

*e-mail: g32zaroe@uco.es



INTRODUCTION

The study of the sources of variability that affects the spectral measurements and how is possible to optimize the repeatability of the instrumental signal is essential for the implementation of on-line analysis with intact products.

In this study, two setting parameters of a handheld instrument have been evaluated to analyze the signal repeatability on intact pork loins

MATERIALS AND METHODS

Fifteen samples of two pork (Duroc x Iberian) muscles were tested: *M. Longissimus* (L) and *M. Spinalis* (S)

A handled MEMS digital transform spectrophotometer was used (Phazir, Polychromix Inc.) working from 1600-2400 nm (spectral resolution ~ 8nm) (Figure 1)

Two instrument setups with different parameters were compared (Table 1)

Multiplicative Scatter Correction (MSC), first derivative and mean-center were used.

Spectral repeatability was evaluated with the statistic Root Mean Square (RMS) of four replicates spectra obtained for each sample of muscle type

Table 1. Setting characteristics of the instrument setup evaluated.

Instrument settings	Lamp Warm-up Time	N° of reference scans	N° of sample scans	Time Between Reference Measurements
A	15 seconds	5	5	15 mins
B	45 seconds	20	10	15 mins

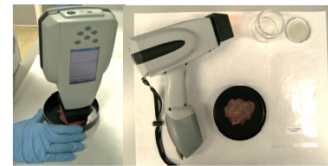


Figure 1. Measurement of NIR spectra on intact pork muscles.

RESULTS

M. longissimus, shows for both instrument settings similar values of RMS average.

M. spinalis shows a slightly improvement of 0.81 in the instrument noise, comparing the mean RMS values, when it is used the settings "B".

First derivative shows the spectral heterogeneity of the same sample analyzed with "A" or "B" (Fig 2). Application "B" shows a slightly smooth tendency (less noisy peaks) of the spectra than "A" for the same muscle.

Table 2. Statistic values for each instrument settings.

Instrument settings	Mean RMS		Mean STD	
	L	S	L	S
A	67,935.06	67,942.46	83,066.38	83,212.18
B	67,231.73	55,126.46	82,341.72	67,515.85

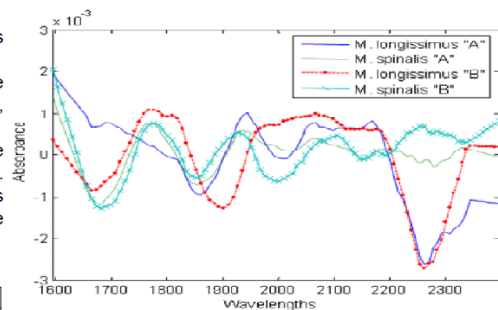


Figure 2. First derivative NIR spectra of a sample of each type of muscle collected with both instrument settings.

FUTURE DIRECTIONS

Once the spectra quality information collected is optimized in products analyzed in its original form, such as pork loins, future directions are focused on: 1) to optimize the sampling method of these heterogeneous products, 2) to understand the basis of the interaction of the radiation with muscle, lipids, etc. present in the loins 3) to transfer existing large libraries files from monochromators to the handheld instruments, 4) to develop robust predictive models, for using the handheld instrument to ensure traceability and quality of fresh and cured Iberian pig loins; 5) to fine tuning of the instrument and software for ensuring it broad use in the Iberian Pig Industry as a "ready to use instrument".

This research formed part of the Research Project: INIA "FIT-2006-060000" and "Safety and traceability in the food chain using NIRS (AGR-285)". The authors are grateful to the Iberian pig producer SAT Vallehermoso for providing the experimental material. Eduardo Zamora-Rojas acknowledges financial support from the Spanish Ministry of Education as a fellow of the Program "Training of University Teachers" (Formación del Profesorado Universitario, FPU)

COMUNICACIONES A CONGRESOS

Nacionales:

II Congreso Científico de Jóvenes Investigadores en Formación y I Congreso Científico de Investigadores en Formación en Agroalimentación. (Córdoba, España)

- Control *in situ* de productos y procesos en la industria del cerdo ibérico usando sensores espectrales de infrarrojo cercano. (Comunicación oral).

Jornadas “Doctores para la Innovación” (Córdoba, España)

- Sensores espectrales no destructivos para la innovación en el control de calidad en la industria del cerdo ibérico. (Comunicación oral).

I Congreso Científico de Jóvenes Investigadores en Formación. (Córdoba, España)

- La Espectroscopía de Infrarrojo Cercano (NIRS) para la autenticación y trazabilidad de productos de cerdo ibérico. (Comunicación oral).

II Congreso Científico de Jóvenes Investigadores en Formación y I Congreso Científico de Investigadores en Formación en Agroalimentación. (Córdoba, España)

Control *in-situ* de productos y procesos en la industria del cerdo ibérico usando sensores espectrales de infrarrojo cercano

E. Zamora-Rojas*, A. Garrido-Varo, E. De Pedro-Sanz, J.E. Guerrero-Ginel y D. Pérez-Marín

Unidad de Sensores Espectrales No Destructivos. Grupo de Investigación “Ingeniería de Sistemas de Producción Agro-Ganaderos” (ISAG). Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y de Montes (ETSIAM). Universidad de Córdoba.

*El autor de este proyecto de tesis doctoral está becado por el Ministerio de Educación del Gobierno de España dentro del Programa de “Formación del Profesorado Universitario (FPU)”.

Introducción:

El sector del cerdo Ibérico (CI) caracterizado tradicionalmente por ser un sistema productivo extensivo ligado a la dehesa del cual se obtienen productos cárnicos selectos y de alto valor en el mercado, ha evolucionado también hacia sistemas productivos intensivos o mixtos que combinan racionamiento con piensos compuestos y cruces con otras razas que proporcionan mejores rendimientos cárnicos y productivos. Este panorama ha aumentado la complejidad del sector frente al consumidor con distintas categorías comerciales según calidad asociada a la raza y al sistema productivo/régimen de alimentación(1).

Los controles oficiales establecidos por la Norma de Calidad (inspección visual y análisis de cromatografía de gases) presentan diversas limitaciones como subjetividad, coste, requiere de personal cualificado o largo tiempo de análisis, entre otras. Además, en los últimos años se ha avanzado en la formulación de piensos que simulan la calidad composicional de productos “Bellota” (extensivo alimentado con recursos naturales de la dehesa)(2). De hecho, todos los participantes en el sector demandan un cambio en la actual normativa. Esto unido al actual reajuste de la producción inducido por la coyuntura económica y financiera hace que se abran nuevas oportunidades para considerar otros sistemas de control de calidad y autenticación en Ibérico.

Una de las tecnologías que ha demostrado su viabilidad en el control de calidad de productos del CI ha sido la Espectroscopía del Infrarrojo Cercano (NIRS)(3,4,5,6). De hecho, la información científica generada ha incentivado

que algunos industriales, con mayor capacidad para la innovación, hayan implementado esta tecnología en laboratorios para la predicción instantánea del perfil de ácidos grasos en muestras de grasa.

Los avances en instrumentación acaecidos en los últimos años (7) abren importantes expectativas a nuevos retos científicos y técnicos en relación a la utilización *in situ* de la tecnología NIRS en diferentes puntos de la cadena de producción de productos derivados del CI.

Material y métodos:

Instrumentación:

Se han empleado tres equipos NIRS con distinta presentación de muestra y modo de análisis:

- Un espectrofotómetro Foss NIRSystem 6500 (Foss-NIRSystems Inc., Sylver Spring, MD, USA) equipado con un módulo giratorio (FNS1) para el análisis en transflectancia de muestras de grasa líquida en condiciones controladas de laboratorio. Este instrumento opera en el rango 400-2500nm con una resolución espectral de 2nm. También se utilizó para analizar en reflectancia muestras de carne picada.

- Un espectrofotómetro Foss NIRSystem 6500 (Foss-NIRSystems Inc., Sylver Spring, MD, USA) equipado con una fibra óptica (FNS2) para el análisis intacto de muestras de tejido adiposo subcutáneo en condiciones controladas de laboratorio. Este instrumento opera en el rango 400-2.500nm con una resolución espectral de 2nm.

- Un equipo portátil NIRS basado en tecnología MEMS (sistemas micro-electro-mecánicos) que trabaja en reflectancia en el rango 1600-2400nm con una resolución espectral no constante de 8nm (Phazir 1624, Polychromix Inc., Wilmington, MA, USA) para analizar *in situ* tejido adiposo en canales dentro de la línea de procesado del matadero. También se utilizó para analizar muestras de carne picada.

Colectivo de muestras:

Se trabaja con una amplia colección de más de 400 muestras de grasa subcutánea de cerdo Ibérico de distintos regímenes alimenticios (“Bellota”, “Recebo” y “Cebo”) controlados por personal técnico cualificado para desarrollar tanto modelos cuantitativos como cualitativos. Estas muestras pertenecen a varias campañas de sacrificio.

Un set de alrededor de 1.300 muestras de carne picada de cerdo Ibérico recogidas en diversos años es empleado para los estudios de supervisión, control y recalibración de calibraciones NIRS de rutina. Parte de la librería que cuenta con análisis de referencia analizada en FNS1 fue transferida al equipo MEMS-NIRS portátil tras analizar un set común de 235 muestras en ambos equipos.

Dichas librerías espectrales, tanto de tejido adiposo subcutáneo como de carne, se están ampliando durante esta campaña.

Tratamiento matemático y estadístico:

Se han empleado distintos algoritmos para el estudio de la estructura de librerías espectrales y detección de muestras anómalas (PCA, GH, NH), desarrollo de calibraciones cuantitativas (PLS), cualitativas (PLS-DA) y de clonación de instrumentos (DS, PDS, SWD). Distintos pre-tratamientos de la señal espectral fueron evaluados: corrección de la dispersión (SNV, DT, MSC) y derivadas (Savitzky-Golay, primera y segunda).

Los software de tratamiento de datos que se están utilizando son WinISI (Infrasoft International, Port Matilda, PA, USA), MATLAB (The MathWorks, Natick, USA) y el paquete quimiométrico PLS Toolbox (Eigenvector Research, Manson, USA).

Principales aportaciones:

El trabajo hasta aquí realizado ha sido divulgado a través de congresos internacionales y publicación en revistas de alto impacto. En dichos trabajos se resumen las principales aportaciones, entre las que se encuentran las siguientes:

- La necesidad de desarrollar grandes librerías espectrales con espectros de alta calidad controlados por parámetros de repetitividad espectral como RMS (Root Mean Square) para poder desarrollar modelos de calibración robustos tras un proceso de validación fiable y que también requieren de evaluaciones periódicas cuando se están aplicando en rutina. Para ello, el uso y entendimiento de estadísticos basados en distancias espectrales puede asegurar la validez de las predicciones y servir de apoyo en la selección de muestras interesantes para metodologías de recalibración de los modelos de rutina de una forma sencilla, económica y precisa (8).

- Se ha demostrado satisfactoriamente la posibilidad de transferir modelos cuantitativos desarrollados en instrumentos de altas prestaciones de laboratorio para predecir composición química en carne picada a equipos portátiles MEMS-NIRS, aunque los errores asociados se incrementen. Este avance simplifica y permite el análisis *in situ* rápido e individual de productos cárnicos (9).

- Equipos portátiles MEMS-NIRS han sido evaluados para la autenticación *in situ* en la línea de matanza de canales de cerdo Ibérico según régimen alimenticio. Más del 90 % de las muestras pertenecientes a categorías extremas (“Bellota” y “Cebo”) fueron correctamente clasificadas con esta instrumentación (10). Una aproximación cuantitativa con el mismo tipo de instrumentación ha demostrado que los errores asociados para predecir el perfil de ácidos grasos en canales, de forma *in situ* en la línea de matanza, si

bien son superiores a otras aplicaciones NIRS desarrolladas en laboratorio, poseen una precisión y exactitud suficiente para la inspección de canales, máxime teniendo en cuenta las ventajas prácticas y técnicas de realizar una inspección individual, rápida, simple y económica.

Principales referencias:

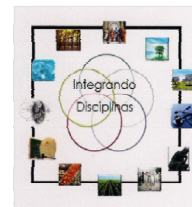
- (1)BOE. (2007). Real Decreto 1469/2007. BOE nº 264.
- (2)Ventanas et al. (2007). Extensive feeding versus oleic acid and tocopherol enriched mixed diets for the production of Iberian dry-cured hams: Effect on chemical composition, oxidative status and sensory traits. *Meat Science*,77(2),324-330.
- (3)Garrido-Varo et al. (2004). Analysis of Fats and Oils. In *Near-Infrared Spectroscopy in Agriculture*, (pp.487-558). Agronomy, CSSA-SSSA, USA.
- (4)García-Olmo et al. (2009). Classification of real farm conditions Iberian pigs according to regime with multivariate models developed by using fatty acids composition or NIR spectral data. *Grasas y Aceites*,60(3),233-237.
- (5)Pérez-Marín et al. (2009). A feasibility study on the use of near infrared spectroscopy for prediction of the fatty acid profile in live Iberian pigs and carcasses. *Meat Science*,83,627-633.
- (7)Schuler et al. (2009). MEMS-based microspectrometer technologies for NIR and MIR wavelengths. *Journal of Physics D: Applied Physics*,42,1-13.
- (8)Zamora-Rojas et al. (2011). Monitoring NIRS calibrations for use in routine meat analysis as part of Iberian pig-breeding programs. *Food Chemistry*,129(4),1889-1897.
- (9)Zamora-Rojas et al. (2012a). Handheld NIRS analysis for routine meat quality control: Database transfer from at-line instruments. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, DOI:10.1016/j.chemolab.2012.02.001
- (10)Zamora-Rojas et al.(2012b). *In-situ* Iberian pig carcass classification using a micro-electro-mechanical systems (MEMS)-based near infrared spectroscopy. *Meat Science*,90,636-642.

Jornadas “Doctores para la Innovación” (Córdoba, España)

Sensores espectrales no destructivos para la innovación en el control de calidad en la industria del cerdo Ibérico

E. Zamora-Rojas*, D. Pérez-Marín, E. De Pedro-Sanz, J.E. Guerrero-Ginel y A. Garrido-Varo

Unidad de Sensores Espectrales No Destructivos. Grupo de Investigación Zootecnia (GIZ). ETSIAM. UCO.



El sector del cerdo Ibérico necesita acciones estratégicas, con repercusión en el mercado nacional e internacional, para garantizar la sostenibilidad del Sistema de Dehesa y sobre todo de sus productos de alta calidad y reputación.

Algunos industriales y sus asociaciones, con mayor capacidad para la innovación, así lo han entendido y vienen colaborando con el GIZ. Fruto de esta labor conjunta, actualmente la tecnología NIRS ha sido implantada en diferentes laboratorios que prestan servicios analíticos a industriales y ganaderos, para la predicción instantánea del perfil de ácidos grasos en muestras de grasa de canales, recogidas según marca la Norma de Calidad del Ibérico.

A nivel de investigación, se ha mostrado que el potencial de la tecnología NIRS es mucho más que el de sustituir el papel de otras técnicas en el análisis de ácidos grasos. En la actualidad, existen sensores NIRS, con una elevadísima rapidez de respuesta, tamaño reducido, portátiles y otras características, que hace que sean candidatos idóneos para ser incorporados en sistemas de apoyo a la decisión (SAD) en tiempo real, en el sector del cerdo ibérico.

Sin embargo, para alcanzar dicho objetivo es aún necesario realizar esfuerzos adicionales de I+D+i y de formación de profesionales especializados. El GIZ trabaja intensamente en la búsqueda de acuerdos para colaborar en la formación de sus doctorandos. Concretamente en actividades de investigación y formación de la tesis realizada por el primer autor de este trabajo, se cuenta con la colaboración de varias empresas del sector del cerdo ibérico (COVAP, AECERIBER, DO Los Pedroches, Sierra de Sevilla), una empresa líder en el diseño de instrumentación NIRS basada en tecnología MEMS (Thermo-Fisher) y varios Departamentos de Ingeniería Electrónica, tanto de la Universidad de Córdoba como de Tokyo y Osaka (Japón).

La tesis mencionada tiene entre sus objetivos avanzar en el conocimiento de la utilización de sensores NIRS, para el control y certificación *in situ* de animales, de forma individual, a nivel de campo y de la canal. La colaboración con la industria se centra en dos aspectos críticos:

- a) Industria del cerdo ibérico: contar con ganaderos e industriales que proporcionen muestras controladas para generar modelos

predictivos NIRS para la certificación de canales según régimen alimenticio u otros parámetros de calidad, así como para el seguimiento de animales en montanera. Fin: diseñar un SAD basado en sensores NIRS portátiles.

- b) Empresas de base tecnológica de diseño y fabricación de instrumentos NIRS: contar con una red de empresas y grupos de investigación que permitan avanzar en la automatización y adaptación de instrumentación de última generación a las necesidades específicas del sector. Fin: diseñar y patentar un instrumento portátil adaptado a las necesidades espectrales-operativas para el control de este tipo de productos.

La presente comunicación mostrará estudios en colaboración con ambas.

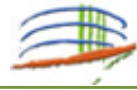
I Congreso Científico de Jóvenes Investigadores en Formación. (Córdoba, España)

UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

E.T.S.I.A.M



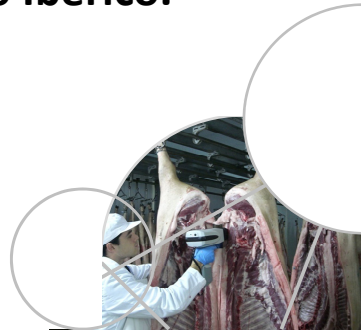
Escuela Técnica Superior de
Ingenieros Agrónomos y de Montes



La Espectroscopía de Infrarrojo Cercano (NIRS) para la autenticación y trazabilidad de productos de cerdo Ibérico.

Eduardo ZAMORA ROJAS

Dpto. Producción Animal
ETSIAM. Universidad de Córdoba
Octubre 2009



9.3.1. Manual práctico para el procesamiento de datos procedentes de equipos Phazir™

Eduardo Zamora Rojas

Esta guía pretende ser un manual práctico para convertir ficheros procedentes de equipos Phazir™ o MicroPhazir™, instrumentos portátiles de espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS) basados en sistemas micro electro mecánicos (MEMS), a otro tipo de formatos de forma que puedan ser utilizados en distintos software de tratamiento de datos (ejemplo: WinISI™ o MATLAB®). Asimismo, se dan algunas nociones referentes a la reducción (interpolación) del rango de longitudes de onda y resoluciones entre instrumentos con distintas características espectrales. En último lugar, se describe brevemente un algoritmo de transferencia de modelos entre equipos portátiles, como Phazir™ o MicroPhazir™, y otros de laboratorio.

Recursos necesarios

En primer lugar, es necesario instalar los siguientes programas informáticos:

- Phazir Data Management System (Polychromix Inc., USA): necesario para convertir los ficheros .pbr que genera originariamente el equipo en .csv (archivo separado por comas).
- Excel (Microsoft Office, USA): necesario para convertir ficheros .csv a .txt (delimitados por tabulaciones).
- MATLAB® (The Mathwork Inc., USA): contiene funciones para poder interpolar entre ficheros de datos con distintos rangos espectrales y/o resoluciones. Igualmente, es útil para la utilización del algoritmo de transferencia descrito en este manual. Se debe instalar el paquete estadístico PLS Toolbox (Eigenvector Research Inc., USA) para disponer de algunas funciones específicas.
- WinISI™ (Infrasoft International LLC., USA): es el programa dedicado a aplicaciones NIRS de los instrumentos comercializados por Foss NIRSystems.

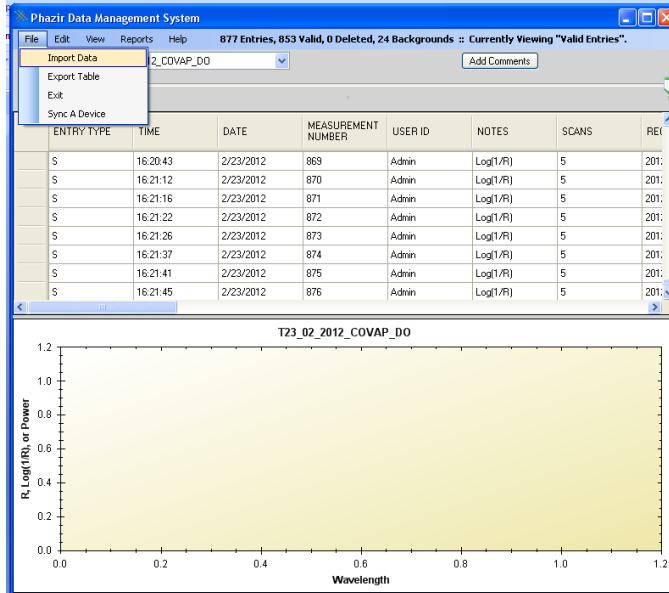
Metodología

En esta guía se van a describir todos los pasos necesarios en orden cronológico desde la descarga de ficheros de Phazir™ o MicroPhazir™, su conversión para poder utilizarlos en WinISI™ y MATLAB®, hasta algunas nociones de transferencia de modelos entre datos de estos equipos y otros procedentes de equipos de laboratorio como Foss NIRSystems.

1.- Conectar el equipo portátil MEMS-NIRS al ordenador mediante el cable USB.

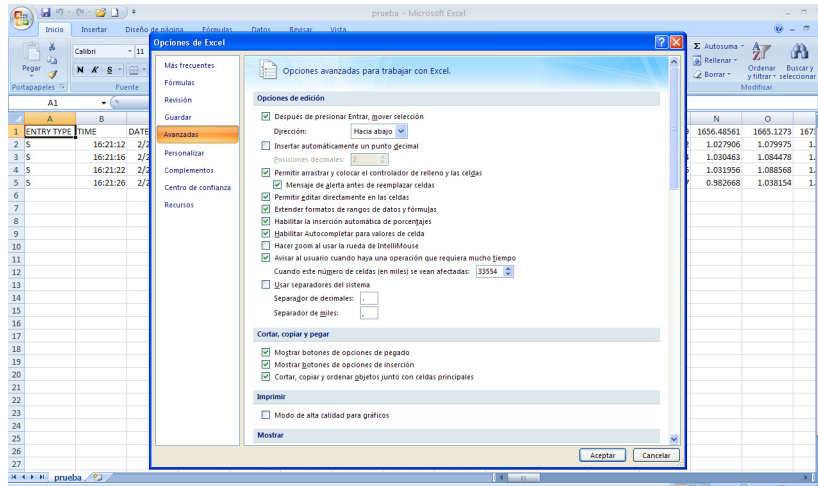
2.- Copiar el archivo generado .pbr con nuestros datos de la carpeta de Phazir™ a la carpeta deseada de nuestro ordenador.

3.- Abrir Phazir Data Management (usuario: ADMIN / Contraseña: 0) e importar (“*import data*”) el fichero .pbr

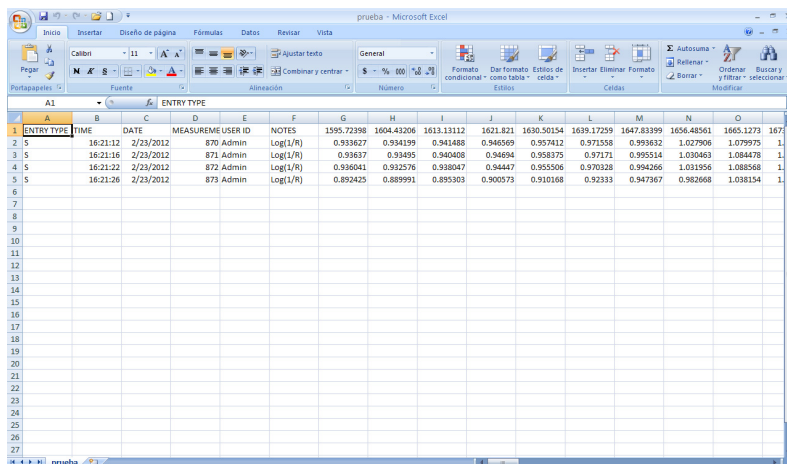


4.- Seleccionar la función “*export table*” para exportar los datos seleccionados en formato .csv

5.- Abrir Excel e importar el fichero .csv donde se encuentran los datos procedentes del equipo Phazir™. Tener en cuenta que en “Opciones de Excel” y seleccionando “avanzadas” debe estar configurado en “separadores del sistema” como decimal el “.” (punto) y miles “,” (coma) para una correcta importación el fichero.



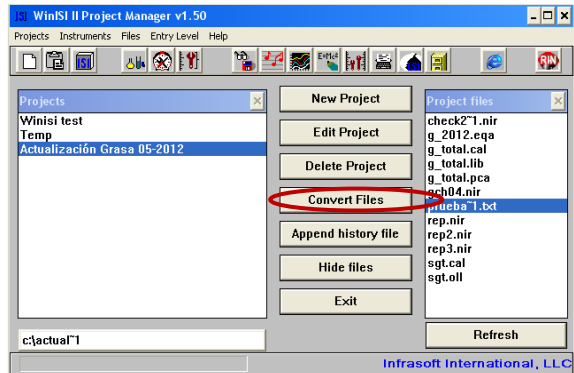
Al importar los datos en Excel, si no los configura automáticamente por columnas, deberemos seleccionar campos “delimitados” por “punto y coma” para que nos separe el conjunto de datos en sus correspondientes columnas.



Una vez en este punto, debemos editar la información que queremos eliminar para dejar en el fichero con la información que nos interesa. Para trabajar en MATLAB[®], eliminaríamos los campos: *Entry Type*, *Time*, *Data*, *User ID*, *Note* y todas las columnas del final después de la longitud de onda 2396.311185 (casilla DB). En el caso de importar el fichero a WinISI[™], se eliminaría también la primera fila que contiene los nombres de las longitudes de onda. El campo/columna “*Measurement*” sería aquel a editar para renombrar los números de espectros con su correspondiente nombre de muestra. No obstante, hay que tener en cuenta que si se quiere trabajar con el software Polychromix Generator Method[™] (PGM), de Polychromix Inc., para generar modelos o aplicaciones, es necesario partir de un fichero que contengan todos los campos originales registrados en el instrumento MEMS-NIRS.

6.- Una vez terminada la edición del fichero se debe salvar como fichero de texto delimitado por tabulaciones (.txt).

7.- Importación a WinISI™: tras guardar el archivo .txt (recordatorio: es el que no incluye la primera fila con las longitudes de onda) en la carpeta donde vamos a trabajar en WinISI™, este archivo se debe convertir a formato .nir. Utilizar la pestaña de “convert files”.



Seleccionada esta opción es necesario tener en cuenta donde vamos a guardar el archivo transformado (“set output directory”) y entonces comenzar la conversión (“begin conversion”) y responder a las distintas preguntas que nos realiza el software:

¿Se encuentran en el fichero los nombres de las muestras? Sí

Número de constituyentes: 0 (en nuestro caso no estamos incluyendo los valores de los parámetros de referencia, sólo la información espectral).

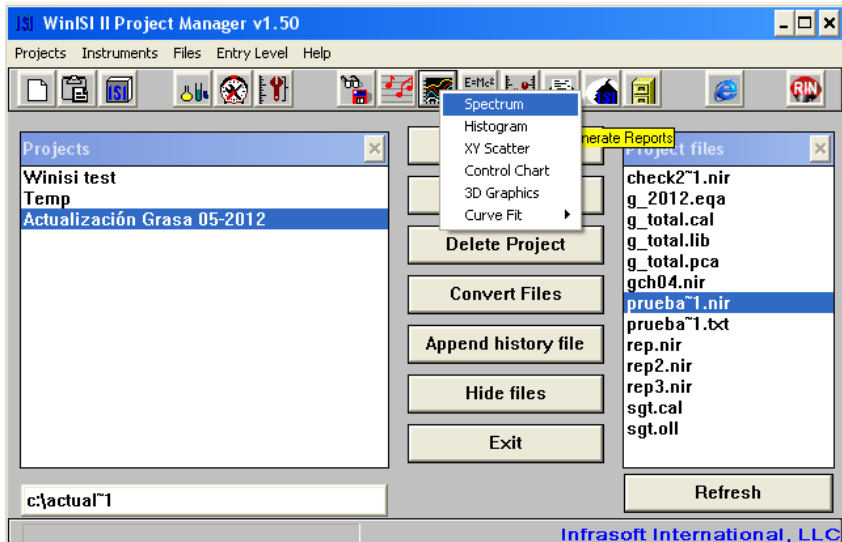
Número de X puntos de datos: 100 (este valor se corresponde con el número de longitudes de onda originales del equipo Phazir™ o MicroPhazir™).

Número de segmentos de escaneo: 1 (sólo hay detector en las versiones actuales de Phazir™ o MicroPhazir™).



Número de la primera longitud de onda: 1 (ya que el incremento entre longitudes de onda no es constante en este tipo de instrumentos).

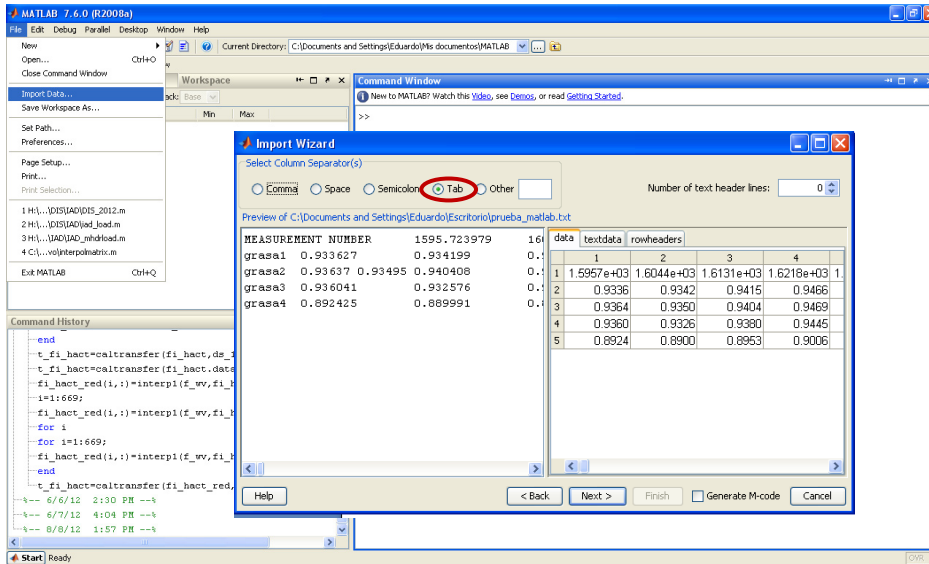
Incremento entre longitudes de onda: 1 (la realidad es que la resolución es de aproximadamente 8 nm, pero no es posible insertar los valores reales).

Tras realizar la conversión se recomienda comprobar cómo se ha realizado la misma con la opción de “plot spectra and scores” del nuevo fichero .nir creado.

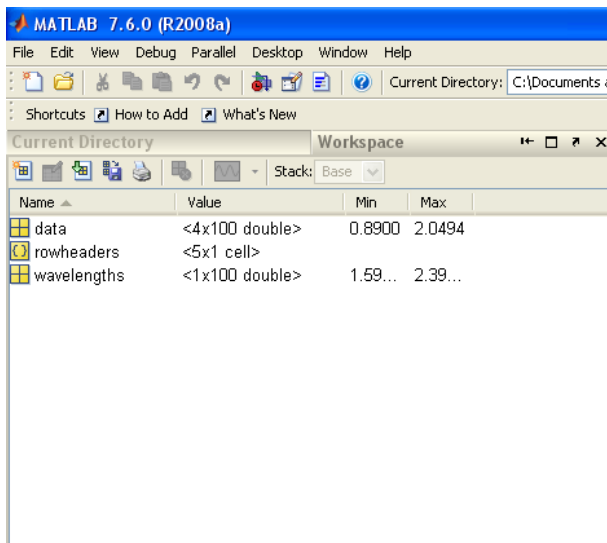


8.- Importación a MATLAB[®]: se va a importar el archivo .txt que contiene los nombres de las longitudes de onda para crear, con PLS Toolbox, un “*data set object (DSO)*” que permita integrar toda la información sobre un colectivo de muestras. Conviene recordar que MATLAB[®] trabaja con matrices de datos numéricos, pero DSO permite crear un único archivo con toda la información de un colectivo (matrices) de forma asociada.

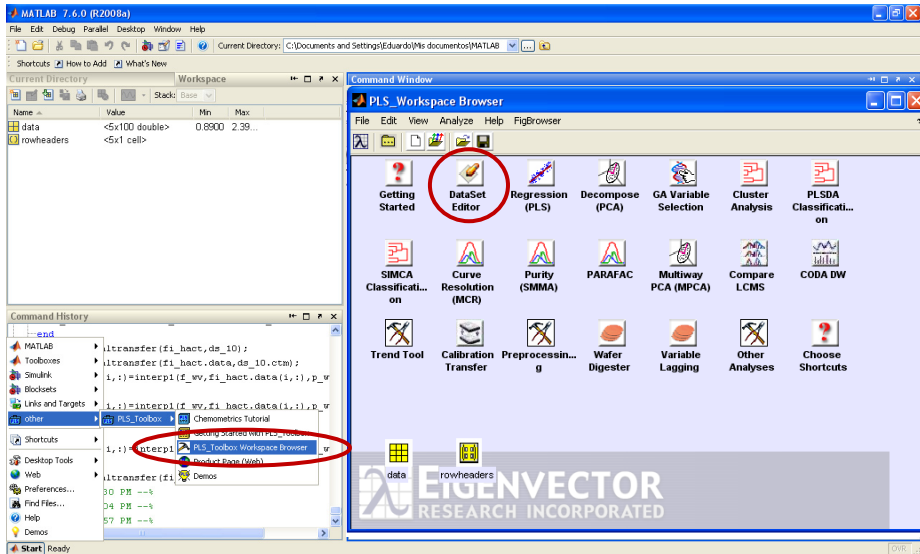
El primer paso es importar el fichero .txt a MATLAB[®]. Para ello, seguiremos la siguiente ruta: “*file*” – “*import data*”. A continuación, nos saldrá una ventana de importación donde seleccionaremos nuestro archivo y, posteriormente, se generará una vista preliminar de los datos donde seleccionaremos como separador de columnas “*tab*”. Esto generará 3 archivos a importar a MATLAB[®]: uno que contiene datos numéricos  *data* y dos que contienen datos alfabéticos  *textdata* (ambos son iguales y contienen los nombres de las muestras, en caso de que éstos no sean números, con lo que importar uno es suficiente).



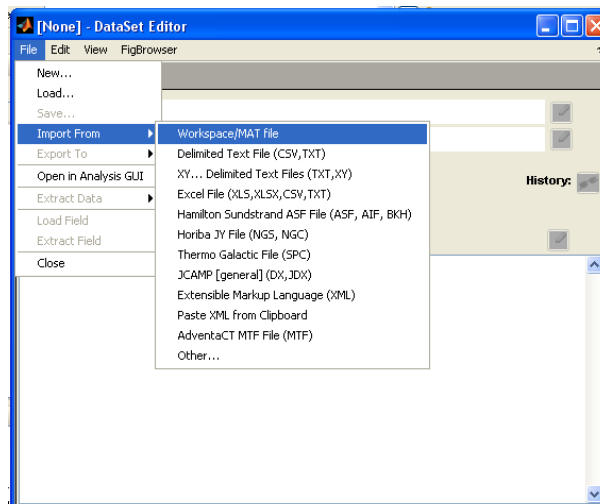
Una vez importado los datos en el “workspace” y antes de crear el DSO, procedemos a crear una nueva variable numérica que sólo incluya los valores de las longitudes de onda, que en este momento se encuentran en el mismo fichero junto con los datos espectrales. Para ello, hacemos doble click en “data” (matriz que contiene los datos espectrales) y cortamos la primera fila que contiene los valores de las longitudes de onda. Creamos una nueva variable en el “workspace” de MATLAB® que denominaremos “wavelengths” y pegamos la fila anterior. De esta forma, debemos tener en el “workspace” tres ficheros:



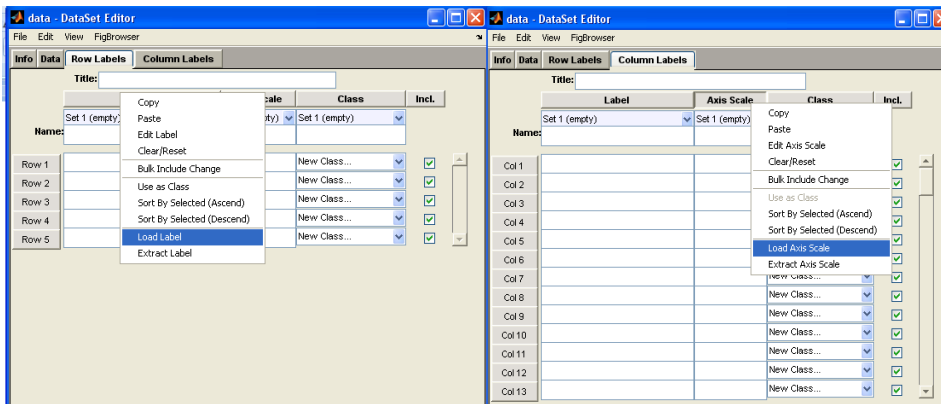
A continuación, procedemos a crear el DSO a través del paquete PLS Toolbox. Para ello, se debe seguir la ruta ejemplificada en la siguiente figura:



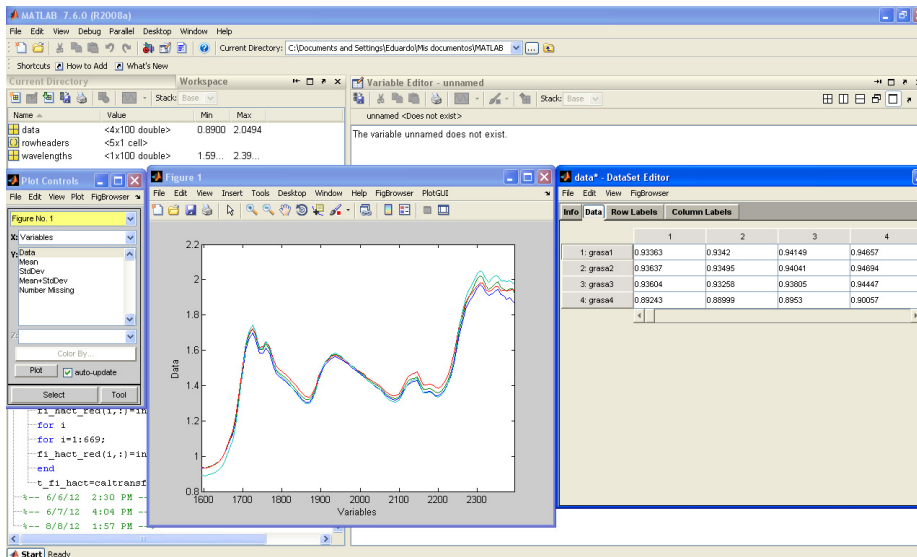
Una vez abierto el DSO, procedemos a importar los datos del “workspace”, seleccionando en primer lugar la matriz numérica de datos “data” (donde se encuentren los datos espectrales)



Posteriormente, se debe incluir en el DSO la información relacionada con los nombres de las muestras (pestaña “row label”) y los nombres de las longitudes de onda (pestaña “column label”). En el caso de importar los valores de las longitudes de onda se debe utilizar la opción de “axis scale”, al ser variables numéricas.



De este modo, quedaría totalmente definido el colectivo de muestras en un DSO que salvaríamos en el “workspace” y, posteriormente, en una carpeta dentro del ordenador (nota: MATLAB® no guarda los ficheros del “workspace” ni ninguna modificación de forma automática, por lo que si se cierra sin guardarlo se perderá toda la información).



Para visualizar la matriz de datos espectrales se debe acceder a la pestaña del DSO “view” y elegir la opción “plot”. Nos saldrá un panel de control que nos permitirá graficar los datos del DOS.

A continuación, se procede a describir la metodología a seguir para poder transferir calibraciones entre equipos de laboratorio como Foss NIRSystems y equipos portátiles como Phazir™ o MicroPhazir™. En esta sección, la información detallada se fundamenta en explicar el procedimiento para hacer que matrices de datos procedentes de distintos equipos con diferentes rangos espectrales y resoluciones o intervalos entre ellas se reduzcan a los mismos

rangos espectrales. Al final de esta sección, también se describe brevemente el algoritmo SDW para la transferencia de bases de datos entre espectrofotómetros.

Recursos necesarios

- MATLAB[®] (debe incluir PLS Toolbox): son necesarias las funciones “interp1”, “SDW” y el paquete de transferencia de calibraciones de PLS Toolbox.

Metodología

Es necesario tener analizado un mismo colectivo de muestras en ambos equipos. Dichos datos se deben importar a MATLAB[®], siguiendo el procedimiento descrito anteriormente, para realizar la transferencia.



Para aplicar la función de interpolación “interp1” y reducir los datos procedentes, por ejemplo, de Foss NIRSystems (rango de longitudes de onda 400-2500 nm y un intervalo entre longitudes de onda de 2 nm) al mismo rango y resolución que Phazir[™] (1600-2400 nm / ~ 8 nm no constante) no son necesarios los datos espectrales de este último equipo, ya que sólo son necesarios los valores de longitudes de onda a las que queremos interpolar los datos de Foss NIRSystems.

Función interp1:

```
output(i,:)=interp1(current_wavelength, input(i,:), target_wavelength, 'method');
```

i = hace referencia al número de muestras que componen la matriz de datos.

output = contendrá la matriz de datos con los nuevos espectros reducidos a las nuevas longitudes de onda.

input = es la matriz de datos iniciales del instrumento a reducir su rango. Hay que tener en cuenta que las funciones de MATLAB[®] trabajan con matrices numéricas  *data* por lo que si nuestra matriz de datos a interpolar se encuentra dentro de un DSO  *dataset* deberemos añadir “.data” al nombre del DSO para extraer sólo la matriz numérica. Ejemplo: input.data(i,:)

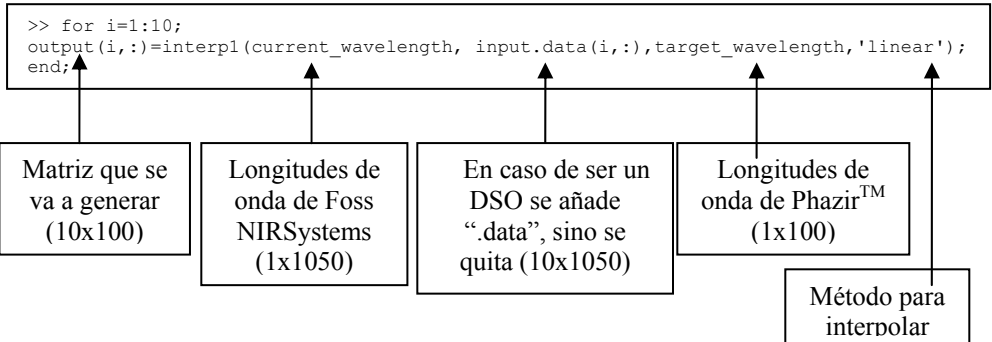
current_wavelength = se corresponde con la matriz que contiene los valores numéricos de las longitudes de onda iniciales del colectivo de datos. En nuestro caso las longitudes de onda del Foss NIRSystems.

target_wavelength = contiene los valores numéricos de las longitudes de onda a las que queremos interpolar nuestro set de datos. En nuestro caso, los valores de longitudes de onda de Phazir[™].

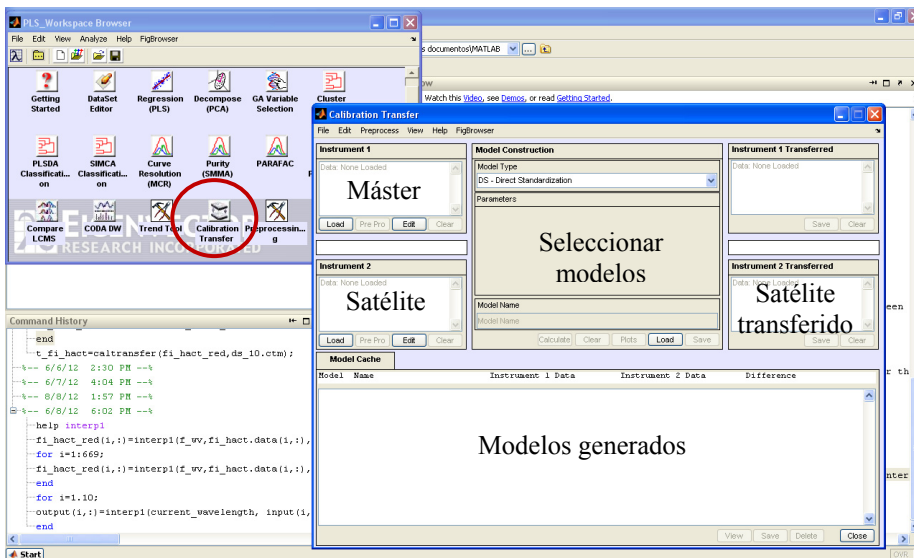
‘*method*’ = se refiere al método de interpolación de la función. Hay distintos métodos como ‘linear’ o ‘spline’. Se debe sustituir ‘*method*’ por la opción elegida incluyendo las comas (ejemplo: ‘linear’). Para conocer más información sobre este aspecto se puede escribir en MATLAB[®] “help interp1”

y nos dará toda la información disponible sobre esta función y como se debe emplear.

Ejemplo: si queremos reducir un colectivo de 10 muestras de Foss NIRSystems a Phazir™, deberemos escribir en MATLAB®:



Una vez que ambos colectivos de datos, procedentes de instrumentos distintos, tienen el mismo rango de longitudes de onda y resolución, se pueden aplicar diversos algoritmos de clonación. Muchos de ellos, se encuentran en la función “*caltransfer*” de PLS Toolbox como PD, PDS etc.



Para no repetir aspectos recogidos en otros manuales, se recomienda consultar la información del paquete de transferencia de modelos de PLS Toolbox (pestaña “*help*”).

El algoritmo *Spectral Difference by Wavelength* (SDW) ha demostrado un gran potencial para clonar equipos portátiles MEMS-NIRS y monocromadores. A continuación, se detalla parte del código utilizado para que pueda ser usado con facilidad por otros usuarios.

```
% Cálculo de la diferencia media de la matriz de estandarización
del equipo MEMS-NIRS (máster) y el equipo Foss NIRSystems
(satélite). Ambos colectivos ya tienen el mismo rango y
resolución, que se ha realizado en una etapa previa. Usar ".data"
si son DSO. Hay que tener en cuenta que estas matrices de
estandarización ya contienen las diferencias individuales de cada
muestra que la componen entre ambos instrumentos.
dif_x=mean(phazir.data,1)-mean(foss.data,1);
% crear una nueva matriz con tantas filas como la matriz a la que
se quiere aplicar, es decir, colectivo de estandarización
for i=1:70; % 70 es para un colectivo de 70 muestras
    dif_x(i,:)=dif_x(1,:);
end;
% aplicar la matriz de estandarización al equipo foss (satélite)
para clonarlo
foss_std=foss.data+dif_x;
% esta función permite generar un fichero .txt para exportar las
matrices creadas
dlmwrite('file.txt',foss_std,'delimiter','\t','precision','%.8f');
```


9.3.2. Practical guideline for using the double integrating spheres (DIS) of MeBioS

Eduardo Zamora-Rojas & Ben Aernouts

This manual is a guideline for measuring samples in the DIS setup located in the research group MeBioS.

- 1.- Switch on the laser's interrupter.
- 2.- Switch on detector power (white device). The voltage should be 15.0 V.
- 3.- Turn on Hamamatsu detector coolers (-20°C).
- 4.- Turn on monochromator, detector A and B.
- 5.- Wait 15 minutes for stabilization.
- 6.- Push green button laser (oscillator). Then, turn on the laser (key position 1).
- 7.- Run Lab-view software to control the setup: DIS_4.2
- 8.- Check that detectors are opened or not.
- 9.- In the software, there is a tag called “monochromator” where you can choose to work in the VIS (grating 1) or NIR (grating 2) regions.
- 10.- Check the position of the light router to send the light to the DIS or to detector B.
- 12.- Check temperature of the room (26°C)
- 11.- Measure instrument calibration's files
- 12.- Calibration procedure:

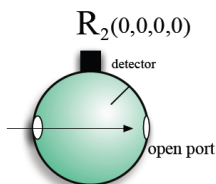
12.1.- Background (Dark):

Laser power = 0

Block spheres and detector A

You can set the time of the monochromator to 0.1s, since now it is not relevant the noise coming from this device now.

12.2.- Open port R:



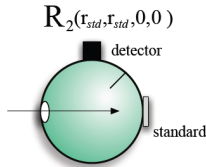
Laser power = 1400. Wait 10 min.

Remove sphere T (leave the sample holder)

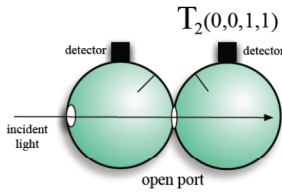
Open R port

Set monochromator time to 1.5s

12.3.- Standard R: Remove sample holder and close the R sphere with the gold standard



12.4.- Standard T: Notice that in the T sphere is only opened the port in contact with the sample holder.

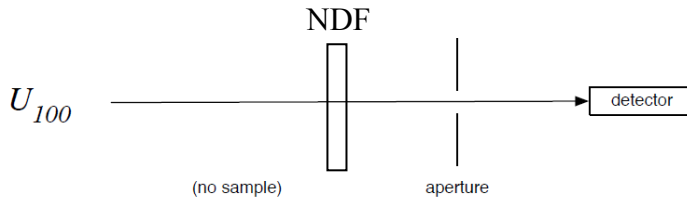


12.5.- Measure sample in the DIS

12.6.- Unscattered transmission measurements (U_{100})

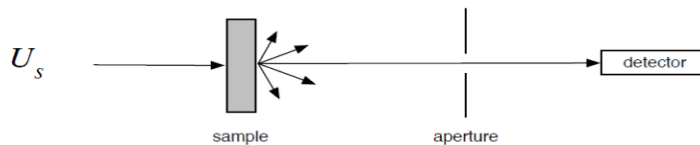
Move the light beam router to send the light to detector B and measure the signal without sample. Set NDF for this measurement.

This measurement has the same value for all the samples (measure one time)



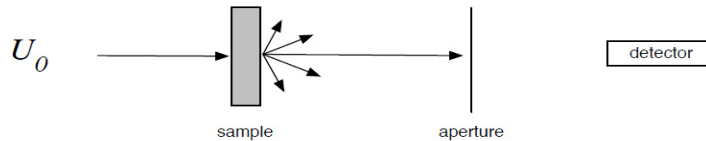
12.7.- Unscattered sample (U_s) Put the sample to be measured.

Remove NDF.



12.8.- Unscattered background (U_0)

Measure the sample and put a blocker between sample and detector B (ideally, it should be measured for each sample, but it is almost the same for everyone).



13.- Set laser power to 0

14.- Turn off laser (key 0) and then the oscillator (button). Wait 5 minutes and, then, switch off from the electricity

15.- Turn off detector coolers

16.- Turn off detectors

17.- Turn off monochromator

Cautions:

Laser power can change over time due to room temperature changes.

The sample should be in the same position in both sample holders (DIS and collimated transmittance). Put the same sample side looking to the laser.

Once that it has been measured the “instrument calibration” measurements, don’t move any part of the set-up.

Light coming from the computer screen can affect measurements, especially in the VIS region.

Save in one folder the “instrument calibration” measurements and in other folder the samples’ measurements.

Sample name should be: “sample_replicate” (e.g. 5IL_1: 1st replicate of the sample 5 % intralipid). Moreover, sample name should not start with a number or include symbols such as %.

