

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA AGRONÒMICA I DEL MEDI RURAL



Aplicación de la técnica de imagen hiperespectral para la inspección de mezclas de carnes de diferentes animales

TRABAJO FIN DE MÁSTER EN GESTIÓN DE LA SEGURIDAD Y
CALIDAD ALIMENTARIA

Alumno: Sandra Camarero Pavía

Director: Raúl Grau Meló

Director experimental: Samuel Verdú Amat

Valencia, 15 de Septiembre del 2015



Aplicación de la técnica de imagen hiperespectral para la inspección de mezclas de carnes de diferentes animales.

Autor: Sandra Camarero Pavía

Director: Raúl Grau Meló¹

Director experimental: Samuel Verdú Amat

RESUMEN

En el presente trabajo se pretende evaluar la eficacia de la técnica de imagen hiperespectral en la detección de posibles adulteraciones en materia prima cárnica, más concretamente presencia de carne de potro en cerdo o en ternera. Para ello se realizaron mezclas binarias de las carnes a diferentes proporciones (1% a 100%) las cuales fueron evaluadas mediante la técnica de imagen y caracterizadas mediante análisis fisicoquímicos. El análisis de los resultados ha mostrado como la técnica de imagen hiperespectral es válida para la detección de la presencia de carne de potro en cerdo o en ternera, con un umbral de detección del 1%. Así los espectros que caracterizan cada muestra han presentado picos característicos que se relacionan directamente con las características fisicoquímicas evaluadas.

Palabras clave: carne, imagen hiperespectral, adulteraciones, potro, ternera, cerdo.

En el present treball es pretén avaluar l'eficàcia de la tècnica d'imatge hiperespectral en la detecció de possibles adulteracions en matèria primera cárnica, en concret presència de carn de poltre en carn de porc i vedella. Per a açò es realitzaran mesclades de carns en diferents proporcions (1% a 100%), que foren avaluades mitjançant la tècnica d'imatge i anàlisis fisicoquímics. L'anàlisi de resultats ha mostrat com la tècnica d'imatge es capaç de detectar la presència de poltre en un 1% en carn de porc y vedella. Així els espectres que caracteritzen cada mostra han presentat pics que han segut relacionats directament amb les característiques fisicoquímiques avaluades.

Paraules clau: carn, imatge hiperespectral, adulteracions, poltre, vedella, porc.

¹ El director y el director experimental ambos pertenecen a la Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera, s/n 46022 Valencia

This work aims to evaluate the efficacy of imaging hyperspectral technique in the detection of possible adulterants in raw meat, mainly foal meat in pork and veal meat. Meat mixtures will be done (1% to 100%) in order to evaluate the detection limit. Results show that the hyperspectral image technique is able to cluster samples with a minimum of 1% of foal in pork and veal meat. In addition spectrum which characterizes each sample has an interesting picks which are related with the physicochemical properties of the evaluated samples.

Key words: meat, hyperspectral imaging technique, adulterants, foal, veal, pork

ÍNDICE TEMÁTICO

Contenido

| | Página |
|--|-----------|
| 1. INTRODUCCIÓN | 5 |
| 2. MATERIAL Y MÉTODOS | 7 |
| 2.1. Materia prima..... | 7 |
| 2.2. Análisis fisicoquímicos..... | 7 |
| 2.2.1. DETERMINACIÓN DE pH | 7 |
| 2.2.2. DETERMINACIÓN DE a_w | 7 |
| 2.2.3. DETERMINACIÓN DE HUMEDAD..... | 7 |
| 2.2.4. DETERMINACIÓN DE GRASA | 8 |
| 2.2.5. DETERMINACIÓN DE HIERRO | 9 |
| 2.3. Análisis de imagen..... | 10 |
| 2.3.1. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS. PROPORCIÓN DE MEZCLA..... | 10 |
| 2.3.2. OBTENCIÓN DE LA INFORMACIÓN HIPERESPECTRAL..... | 10 |
| 2.4. Análisis estadísticos..... | 11 |
| 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 12 |
| 3.1. Resultados de los análisis físico-químicos..... | 12 |
| 3.2. Resultados de los análisis mediante técnicas de imagen..... | 13 |
| 4. CONCLUSIÓN | 19 |
| 5. REFERENCIAS | 19 |

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

| TABLAS | | |
|----------|---|--------|
| | | Página |
| Tabla 1 | Proporciones de carne de potro, ternera y cerdo en las mezclas | 10 |
| Tabla 2 | Resultados de los análisis fisicoquímicos de ternera, potro y cerdo | 12 |
| Tabla 3 | Información de los PLS de cada variable fisicoquímica estudiada | 18 |
| FIGURAS | | |
| | | Página |
| Figura 1 | Configuración del equipo de imagen hiperespectral | 11 |
| Figura 2 | Agrupación espontánea de las mezclas y las muestras puras de potro, ternera y cerdo en función de los componentes PC1 y PC2 | 14 |
| Figura 3 | Agrupación espontánea de las muestras de cerdo y potro en función del PC1 y del PC2 | 15 |
| Figura 4 | Gráfico de control multivariante con muestras de cerdo y potro puro y sus mezclas | 16 |
| Figura 5 | Gráfico de control multivariante con muestras puras y mezclas de ternera y potro | 17 |
| Figura 6 | PLS de las muestras puras de potro, ternera y cerdo y sus mezclas | 18 |
| Figura 7 | Media de los espectros para las muestras 100% cerdo, ternera y potro | 19 |

1. INTRODUCCIÓN

Hoy en día garantizar la salud de los consumidores es una preocupación importante en el control de los alimentos producidos. La gestión de los riesgos en materia de seguridad en los alimentos consumidos se centra en aquellos peligros que ocurren de manera natural en los propios alimentos, o que se producen de forma no intencional durante el procesamiento, el almacenamiento o la manipulación en la cadena de producción. Sin embargo, los consumidores, la industria y las autoridades cada vez son más conscientes de que los riesgos anteriormente descritos no son los únicos que se dan en la industria, los fraudes, las adulteraciones y la negligencia criminal están cobrando poco a poco importancia (Tähkäpää et al., 2015).

El término 'adulteración' o 'fraude' en el ámbito alimentario hace referencia a la adición de ingredientes extraños o inferiores al producto en cuestión, es decir, la sustitución parcial o completa de productos de alto valor comercial por aquellos que presentan un valor inferior con el objetivo de incrementar las ganancias (Premanandh, 2013). Uno de los principales hechos que se relacionan con los fraudes en los últimos años es el error en el etiquetado. Los consumidores confían en la exactitud del etiquetado de los productos que habitualmente consumen, para ayudarles a elegir aquellos alimentos que demandan, ya sea por motivos religiosos, éticos o relacionados con la salud en referencia a alergias e intolerancias (Ballin, 2010). Desde el siglo XIX, la Revolución industrial intensificó el fraude y la adulteración alimentaria. La carne era más difícil de adulterar, ya que la mayoría se vendía como producto fresco, sin ningún tratamiento previo, pero con el paso del tiempo, los productos están mucho más procesados y con ello aumenta la posibilidad de adulteración en ellos (Zajac et al., 2014). Algunos de los estudios de mercado previos realizados en México, Turquía y Sudáfrica han reportado tasas de errores en etiquetado de aproximadamente 20-70% para una variedad de productos cárnicos, incluyendo salchichas, bolas de carne, embutidos y carnes secas (Kane y Hellberg, 2016).

En el 2013 se hallaron contaminaciones de carne de caballo en diversos productos en el mercado de Grecia, al parecer la Comisión Europea solicitó realizar una serie de controles e investigaciones, en las cuales se tomaron unas 288 muestras de productos cárnicos, de las que 36 fueron positivas a la presencia de carne de caballo. Parece ser que todas las muestras positivas, a excepción de dos, eran a base de carne picada y hamburguesas, productos que antes de venderse son manipulados. En el mismo año, otro escándalo sucede, pero esta vez en España, se detectan restos de carne de caballo en las albóndigas ofrecidas por una gran compañía internacional sueca, las cuales fueron retiradas inmediatamente después de saltar la noticia.

Con el objetivo de evitar los fraudes, las autoridades han remarcado la necesidad de incrementar los controles alimentarios así como la urgencia de

métodos rápidos de detección de diferentes especies en muestras de carne. Existen diferentes métodos utilizados en la detección y cuantificación de carne de caballo, basados en ensayos enzimáticos, análisis de los ácidos grasos saturados e insaturados, separación cromatográfica, espectrometría de masas, electroforesis de las proteínas solubles e inmunoensayos (ELISA). Más tarde se desarrollaron otras técnicas, como la PCR a tiempo real. En otros ensayos también se utiliza la mioglobina como marcador para la identificación de la carne de caballo (Di Giuseppe et al., 2015). El análisis de imagen hiperespectral es otra de las técnicas que se han desarrollado para la detección de posibles fraudes en materia cárnica. Es una poderosa técnica que combina la información de la distribución espacial y la composición química del producto analizado. En determinados casos se ha utilizado para la detección de defectos y propiedades relacionadas con la composición de los productos cárnicos (Díaz et al., 2011). Se trata de análisis no destructivos que integran técnicas de espectroscopía y de imagen en un solo sistema que elabora un mapa espacial de la variación espectral de cada muestra, es decir, se generan diferentes imágenes de un mismo objeto pero cada imagen representa un rango del amplio espectro electromagnético, también conocido como bandas espectrales, cada una a diferente longitud de onda (Wu y Sun, 2013). Cada espectro generado es único, como una huella dactilar, de forma que cada muestra analizada tiene su propio espectro y dentro de este espectro se encuentran aquellos componentes que forman parte de la muestra. En el caso de la materia cárnica, aquellos componentes que se utilizan para caracterizar la muestra y discernirla de otras son el agua, la grasa, el perfil de ácidos grasos, el pH o los posibles contaminantes que tenga la muestra, entre otros. Cada componente se estudia en torno a un rango de longitud de onda, según el artículo de Wu y Sun, 2013, el agua y el pH en productos cárnicos se relacionan con el rango de 900-1700 nm, el contenido graso en el de 760-1040 nm y en el rango de 1000-2300 nm los ácidos grasos. Como se observa cada rango de estudio es amplio, de forma que cada tipo de muestra tendrá su componente a estudiar en una determinada longitud de onda, hecho que nos permite diferenciar entre distintos tipos de carne. Se generan así una gran cantidad de variables a estudiar, posteriormente tratadas con técnicas estadísticas multivariantes para poder interpretar los resultados obtenidos.

El objetivo del trabajo es evaluar la capacidad de la técnica de imagen multiespectral para la detección de adulteraciones en muestras cárnicas, más concretamente la presencia de potro en cerdo y ternera.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Materia prima

La materia prima utilizada en el presente estudio fue carne de cerdo, ternera y potro, más concretamente el músculo *Longissimus dorsi*.

2.2. Análisis fisicoquímicos

En primer lugar, y con objeto de caracterizar las muestras puras de ternera, potro y cerdo, a fin de comparar los resultados con los obtenidos con la técnica de imagen, se procedió a realizar análisis fisicoquímicos que habitualmente se llevan a cabo en la industria (pH, a_w , humedad, grasa y hierro). Para realizar estos análisis, las muestras fueron previamente picadas y homogeneizadas, realizándose los análisis por triplicado.

2.2.1. DETERMINACIÓN DE pH

La determinación de pH se realizó mediante un pHmetro de punción (Grison ph-meter Basic 20+), realizándose la medición directamente sobre la carne. En este caso el número de mediciones fue de cinco.

2.2.2. DETERMINACIÓN DE a_w

Para la determinación de la actividad de agua se utilizó el equipo "Aqua Lab", modelo 4TE, distribuido por la empresa Lab-Ferrer Decagon Devices Inc, Cervera, España, previa calibración con una disolución saturada de sulfato potásico, trabajando a una temperatura de 25°C. Este equipo basa su medida en la técnica de punto de rocío. Las muestras previamente homogeneizadas (aproximadamente 5 g) se colocaron en un porta muestra y se midió por lectura directa el valor de a_w hasta obtener 3 lecturas iguales consecutivas de cada muestra.

2.2.3. DETERMINACIÓN DE HUMEDAD

La humedad se determinó mediante el método de la AOAC 950.46 (1997). Los pesasustancias con arena de mar y varilla de vidrio se secaron en estufa (Service Binder) a $103 \pm 2^\circ \text{C}$ durante 24 horas. A continuación, se atemperaron en un desecador y se pesaron en una balanza analítica (m_0). Se añadieron 10 g de muestra triturada y se pesó de nuevo el pesasustancias con varilla, arena y muestra (m_1). Con ayuda de la varilla de vidrio, se homogenizó la muestra con la arena de mar, favoreciéndose la salida de agua del producto. Las muestras se mantuvieron en estufa a $103 \pm 2^\circ \text{C}$ durante 24 h, período tras el cual, los pesasustancias se atemperaron en desecador y se tomó el peso de

éstos (m_2). El porcentaje de humedad expresado como gramos de agua por 100 g de muestra, se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{humedad (x}^w) = \frac{m_1 - m_2}{m_1 - m_0} \quad (1)$$

dónde:

m_0 = masa del pesasustancias con arena y varilla (g)

m_1 = masa del pesasustancias con arena y varilla antes de la desecación (g)

m_2 = masa del pesasustancias con arena y varilla después de la desecación (g)

2.2.4. DETERMINACIÓN DE GRASA

El contenido en grasa se determinó de acuerdo con el método, 991.36 de la (AOAC, 1997). Para el análisis se utilizaron las muestras previamente secadas para la determinación de la humedad. La extracción de la grasa de las muestras se llevó a cabo mediante un Soxhlet utilizando el equipo (Foss Soxtec TM 2055) y 90 mL de éter de petróleo como disolvente. Las muestras previamente secadas se depositaron en las cubetas del equipo (que también habían sido anteriormente pesadas vacías) y se inició la extracción. Cuando finalizó la última fase, las cubetas se introdujeron en la estufa a 103 °C durante 30 minutos para eliminar los restos de disolvente, después se depositaron en el desecador hasta conseguir un peso constante y se pesaron en la báscula. Para obtener el porcentaje de grasa en la muestra se igualó el peso inicial a 1 gramo con el objetivo de tener unos resultados comparativos en los que se expresase los gramos de grasa por cada gramo de muestra. Las ecuaciones utilizadas fueron las siguientes:

$$P_2 = P_1 - P_0 \quad (2)$$

Dónde P_2 = gramos de aceite en la muestra; P_1 = peso de la cubeta + grasa; P_0 = peso de la cubeta vacía

$$Pf = \frac{P_2}{Pi} \quad (3)$$

Dónde Pf = gramos de grasa en 1 gramo de muestra; Pi = gramos de muestra inicial.

2.2.5. DETERMINACIÓN DE HIERRO

Para la determinación del hierro en las muestras de potro, ternera y cerdo se utilizó el método de Hornsey (1956), citado en numerosos artículos, entre los que destacan Ma et al., 2015, Pretorius et al., 2015 y Ramos et al., 2012. Se llevaron a cabo tres muestras de cada tipo de carne. Inicialmente se pesaron cinco gramos de cada carne a la que se le adicionó 1 mL de agua destilada para diluir la muestra. Se añadieron 20 mL de acetona y 0,5 mL de ácido clorhídrico a cada muestra y se agitaron utilizando un equipo ultraturrax (IKA® T25 digital Ultra-Turrax®) durante unos 45 segundos. Las muestras se filtraron utilizando papel de filtro y se guardaron en la oscuridad hasta el análisis. Se depositaron las muestras en las cubetas de cuarzo de 1 cm de lado y se analizaron utilizando un espectrómetro (Helios Zeta UV-Vis) a una longitud de onda de 513 nanómetros y una medición en continuo. Se llevaron a cabo dos mediciones de absorbancia por cada muestra. La cantidad de hierro se obtuvo utilizando las siguientes ecuaciones (Merck, 1989) mencionadas en el artículo de Franco et al., 2011:

$$x = \text{Abs} \times 342,44 \quad (4)$$

Dónde x= cantidad de hematina, expresada en µg de hematina por gramo de músculo; Abs= absorbancia medida

$$y = \frac{X - 8,82}{100} \quad (5)$$

Dónde y = cantidad de hierro hemo expresado como miligramos de hierro por 100 gramos de carne.

Como el objetivo era comparar el resultado entre los tres tipos de carne, se obtuvo la cantidad de hierro en 1 gramo de carne y posteriormente fue expresado en ppm (miligramos de hierro por kilo de carne) utilizando las siguientes ecuaciones:

$$\text{Fe} = \frac{P_o * y}{100} \quad (6)$$

Dónde Fe= cantidad de hierro en 1 gramo de carne; P_o= cantidad de muestra inicial.

$$\text{Fe}' = \frac{\text{Fe}}{P_o \times 10^{-3}} \quad (7)$$

Dónde Fe'= cantidad de hierro expresado en miligramos de hierro por kilo de carne.

2.3. Análisis de imagen

2.3.1. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS. PROPORCIÓN DE MEZCLA

Una vez troceada y picada la carne se procedió a realizar las mezclas de carne. Las mezclas se prepararon con la finalidad de evaluar la presencia de carne de potro en carnes de cerdo y de ternera. Para ello las mezclas binarias que se formularon fueron las que se presentan en la Tabla 1. Cada una de las mezclas de las carnes, una vez homogeneizadas, fue introducida en placas Petri para la toma de imágenes.

TABLA 1. Proporciones de carne de potro, ternera y cerdo en las mezclas.

| | % | | | | | | | | | | |
|-----------------|-----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|
| Potro | 0 | 1 | 3 | 5 | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 75 | 100 |
| Cerdo o Ternera | 100 | 99 | 97 | 95 | 90 | 80 | 70 | 60 | 50 | 25 | 0 |

2.3.2. OBTENCIÓN DE LA INFORMACIÓN HIPERESPECTRAL

Las medidas de imagen se realizaron con un sistema de dos módulos desarrollado por el Instituto de Automática e Informática Industrial (ai2) y el grupo Cuiina del departamento de tecnología de alimentos de la UPV (Ivorra et al, 2013; Verdú et al. 2015) (Figura 1).

En el primer módulo se realizó la captura de imágenes. Para ello se montó y calibró el conjunto de la cámara CCD 102f (Basler Vision Technologies., Ahrensburg, Alemania) y el filtro Specim ImSpector V10 1/2" (Specim Spectral Imaging, LTD., Oulu, Finlandia) que se comportó como una cámara multispectral lineal que abarca desde el rango visible hasta el infrarrojo cercano, con un rango de 400 a 1040 nm de longitud de onda. La iluminación de la muestra se realizó con dos lámparas de luz halógenas HI-SPOT 50W 230V (Havells Sylvania, Gennevilliers, Francia) de forma indirecta para evitar en lo posible reflejos. La posición del iluminante y de la cámara siempre fue constante para obtener el mismo tamaño de imágenes. Se dejaron 18 cm de distancia entre el iluminante y la muestra y 40 cm entre la muestra y la cámara.

Sobre cada una de las muestras se tomaron 6 imágenes lineales de 1 pixel de anchura, a partir de las cuales se obtuvo la información de reflectancia difusa. Dicha reflectancia se obtiene como la diferencia entre la obtenida a partir de la escena vacía y la obtenida tras la interacción de la luz con la muestra. La información obtenida se procesa y expresa como una imagen en escala de grises. Posteriormente se obtienen los espectros de reflectancia. Una vez normalizados los espectros, se calcula la inversa de su logaritmo y se le

aplica una función de ajuste al entero más cercano para mejorar su visualización.

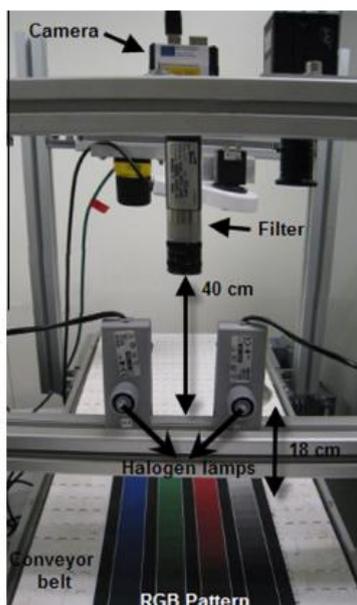


Figura 1. Configuración del equipo de imagen hiperespectral

2.4. Análisis estadísticos

Con el objetivo de comprobar la existencia de diferencias significativas entre los diferentes tipos de carne en los análisis fisicoquímicos, se realizaron análisis de la varianza (ANOVA simple) con un nivel de confianza del 95%. En el caso que existieron diferencias significativas, las medias se compararon con la distribución Fisher. El estudio se realizó utilizando el programa estadístico Statgraphics Centurion XVI.

Para el estudio de los datos procedentes del análisis de imagen y, dado el gran volumen de información que estas generan, se utilizaron herramientas estadísticas multivariantes como PCA (Análisis de Componentes Especiales), gráficos de control multivariantes (Multivariate Control Charts MCC) y PLS (Regresión de mínimos cuadrados parciales).

El análisis de componentes principales o PCA es un método descriptivo de análisis de la interdependencia de variables, el cual pretende analizar el peso de estas, así como la reducción del número de las mismas manteniendo la máxima variabilidad explicada. . En nuestro caso, mediante el estudio se pretende ver si existe una agrupación espontánea de las muestras al producirse la reducción de variables (Girón et al., 2015), agrupación que será, en su caso, relacionada con el tanto por cien de mezcla.

Los gráficos de control multivariantes son una adaptación de los gráficos de control univariantes cuando en el proceso hay que tener en cuenta un número relativamente elevado de variables, así como la relación existente entre ellas. Su función es testar nuevos casos de forma continua determinando su conformidad en base a un modelo preconcebido. Los casos que presentan características no acordes a este son clasificados fuera de los umbrales de aceptación y posteriormente estudiadas las características (variables) culpables del suceso, para así modificarlas y/o corregirlas (Li Vigni et al., 2009). En nuestro estudio, la técnica se ha usado para evaluar qué muestras (con potro añadido) son diferentes a la de cerdo puro o ternera pura.

La regresión de mínimos cuadrados parciales o PLS es un método de estudio de la dependencia de variables en información de dimensionalidad elevada. Se fundamenta en la reducción de la dimensionalidad de una matriz que contiene información multivariable de variables dependientes y la posterior regresión lineal frente a una variable independiente de interés. En este caso, se utilizó para relacionar la información aportada en los análisis de imágenes hiperespectrales (54 variables dependientes: reflectancia a cada longitud de onda) con aquella que nos aportan los análisis fisicoquímicos de forma individual (5 variables independientes: pH, a_w , x^w , x^f , Fe).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Resultados de los análisis físico-químicos

A continuación, en la Tabla 2, se muestran los resultados de los análisis fisicoquímicos realizados a las muestras puras de ternera, cerdo y potro, con sus medias y desviaciones estándar, así como las diferencias estadísticas (p -value < 0.05) expresadas por diferentes letras en la misma columna.

TABLA 2. Resultados de los análisis fisicoquímicos de ternera, potro y cerdo

| | pH | a_w | x^w | x^f | Fe hemo (mg/L) |
|---------|---------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Ternera | 5,46 ± 0,02 b | 0,991 ± 0,003 a | 0,724 ± 1,16 a | 0,046 ± 0,002 a | 23,11 ± 4,53 ab |
| Potro | 5,49 ± 0,01 b | 0,989 ± 0,003 a | 0,753 ± 0,31 b | 0,013 ± 0,008 b | 43,34 ± 16,69 b |
| Cerdo | 5,39 ± 0,06 a | 0,989 ± 0,001 a | 0,737 ± 1,17 ab | 0,021 ± 0,01 b | 15,60 ± 4,38 a |

Diferentes letras dentro de las columnas representan diferencias significativas con un nivel del confianza del 95%

Los valores pH si bien fueron similares entre las muestras y a los reportados por otros autores (Nache et al., 2015, Yang et al., 2014 y Lorenzo et al., 2014),

los obtenidos para la carne de cerdo ($5,39 \pm 0,06$) fueron menores, presentaron diferencias significativas con los de la carne de ternera ($5,46 \pm 0,02$) y de potro ($5,49 \pm 0,01$). En cambio ninguna diferencia se observó para la actividad de agua, siendo los valores de 0,99, valores ligeramente altos pero similares a los obtenidos por Traffano-Schiffo et al., 2015.

Los resultados del análisis de humedad mostraron diferencias significativas entre las muestras de carne de ternera y de potro. Como se aprecia en la Tabla 2, la ternera fue la que presentó menores valores ($0,724 \pm 1,16$), siendo los valores para la de potro $5,49 \pm 0,01$.

Los valores para el análisis de grasa, coincidiendo con la información que aparece en artículos como Lorenzo et al., 2014, mostraron como la carne de potro es la menos grasa ($0,013 \pm 0,008$), si bien estadísticamente no fueron significativamente diferentes con los de cerdo ($0,021 \pm 0,01$). Los valores para la carne de ternera fueron los más elevados ($0,046 \pm 0,002$).

En cuanto a los valores de hierro hemo, como queda reflejado en artículos como el de Lorenzo y Pateiro, 2013, la carne de potro es la que más cantidad de hierro presenta en comparación con las otras carnes analizadas ($43,34 \pm 16,69$) si bien solo tuvieron diferencias significativas con las muestras de cerdo ($15,6 \pm 4,38$), siendo el valor para las muestras de ternera intermedio ($23,11 \pm 4,53$).

3.2. Resultados de los análisis mediante técnicas de imagen

Una vez realizada la captura de imágenes para cada una de las combinaciones binarias cerdo-potro y ternera-potro, así como para las muestras puras de potro, ternera y cerdo, se procedió a su estudio (Tabla 1). Se procedió a realizar un análisis de componentes principales (PCA) con la finalidad de evaluar la agrupación espontánea de las muestras. Como se observa en la Figura 2, se muestran las dos primeras componentes, estas fueron capaces de explicar el 96,65% de la varianza, siendo la componente 1 (PC1) con un valor de 87,31% la que presentó mayor peso.

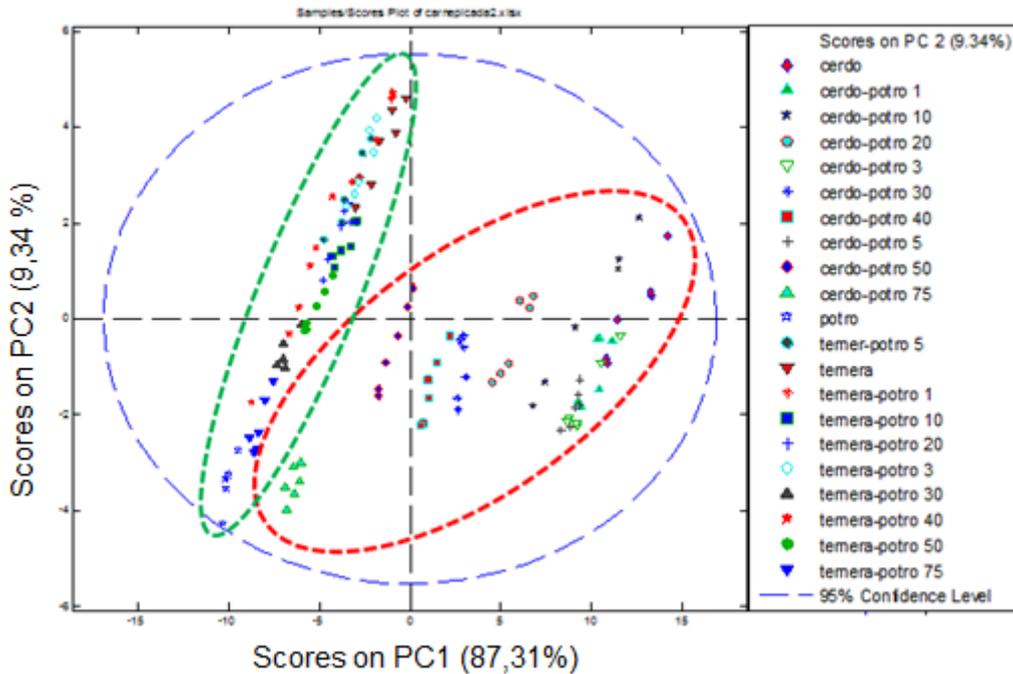


Figura 2. Agrupación espontánea de las mezclas y las muestras puras de potro, ternera y cerdo en función de los componentes PC1 y PC2.

Observando la Figura 2 se aprecia cómo se generaron principalmente dos grupos, aquellos correspondientes a las mezclas realizadas con carne de cerdo (elipse de línea discontinua roja) y las hechas con carne de potro (elipse de línea discontinua verde). Este resultado podía ser esperado dada la menor coloración rojiza de la carne de cerdo respecto a la de ternera y potro. En base a este resultado se procedió a realizar el estudio por separado, por un lado las muestras compuestas por la mezcla cerdo-potro y por otro las formadas por ternera-potro.

En primer lugar se estudiaron las muestras de cerdo y potro. Se realizó de nuevo un PCA (Figura 3), con un peso de la PC1 del 93,25% del total de la variabilidad, y de 4,27% para la PC2. Como se observa, las muestras fueron agrupadas de forma espontánea ofreciendo una visión general de todas las mezclas realizadas, ordenándose de derecha a izquierda en concentración creciente de potro en la muestra. Podemos observar que el equipo es capaz de diferenciar en mayor medida aquellas muestras que contienen un porcentaje mayor de potro. En cambio aquellas mezclas que contienen un menor porcentaje, 1%, 3% y 5% de potro (muestra en el interior de la elipse de línea amarilla discontinua) no se discriminan tanto de las muestras de cerdo puro.

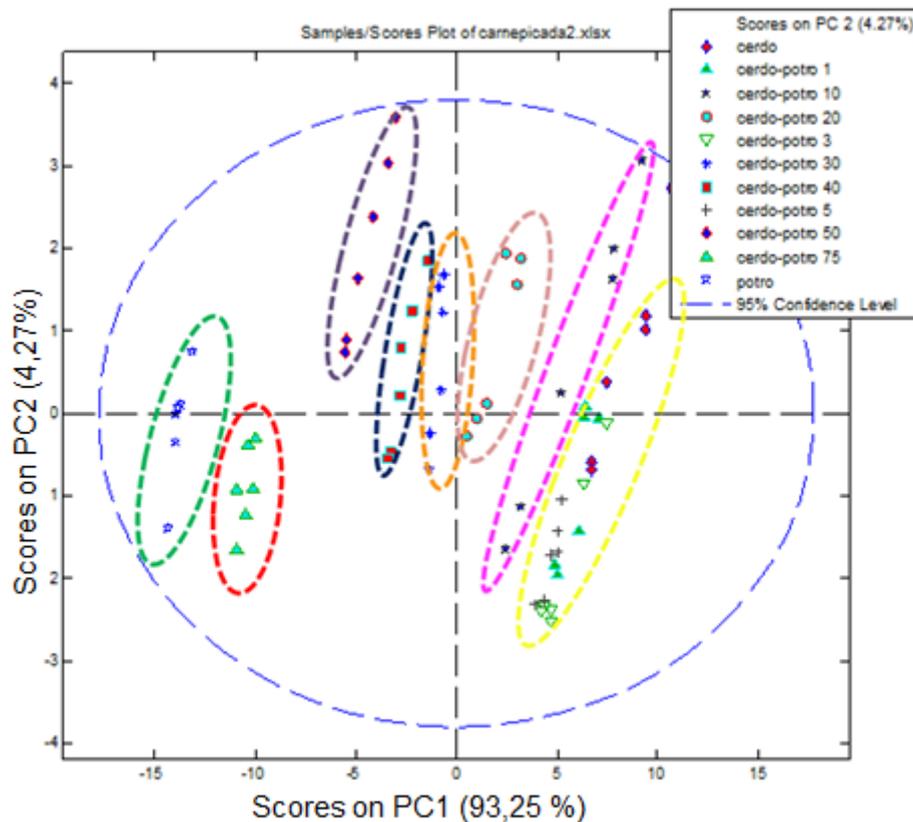


Figura 3. Agrupación espontánea de las muestras de cerdo y potro en función del PC1 y del PC2.

En base a lo observado en el PCA se procedió a realizar un gráfico de control multivariante. El control estuvo basado en un modelo realizado sobre la información hiperespectral de las carnes de cerdo y ternera puras. En el primer estudio se modeliza las muestras de cerdo y mediante el análisis de los “Q-residuos”, (estadístico por el cual se determina la diferencia de las muestras nuevas con las muestras del modelo) se determinan las muestras adulteradas. El umbral de decisión se calcula \pm tres desviaciones estándar de los Q-residuos de las muestras que forman el modelo. Como se observa en la Figura 4, todas las muestras fueron consideradas como diferentes de la muestra 100% cerdo (en el recuadro ampliado, las muestras están sobre la línea azul discontinua que marca el límite), por lo que desde el punto de vista de este estudio estadístico, el equipo sería capaz de evaluar si una muestra analizada presenta más de 1% de carne de potro, aunque como el estudio estadístico no es cuantitativo no nos podría cuantificar que cantidad de potro presentaría la muestra.

Dado que el volumen de muestras no es muy elevado y que habría que estudiar diferentes variables como tipo de músculo de cada animal, tiempo de

postmortem, efecto de la congelación, etc, no se ha creído conveniente utilizar un modelo estadístico de cuantificación-predicción.

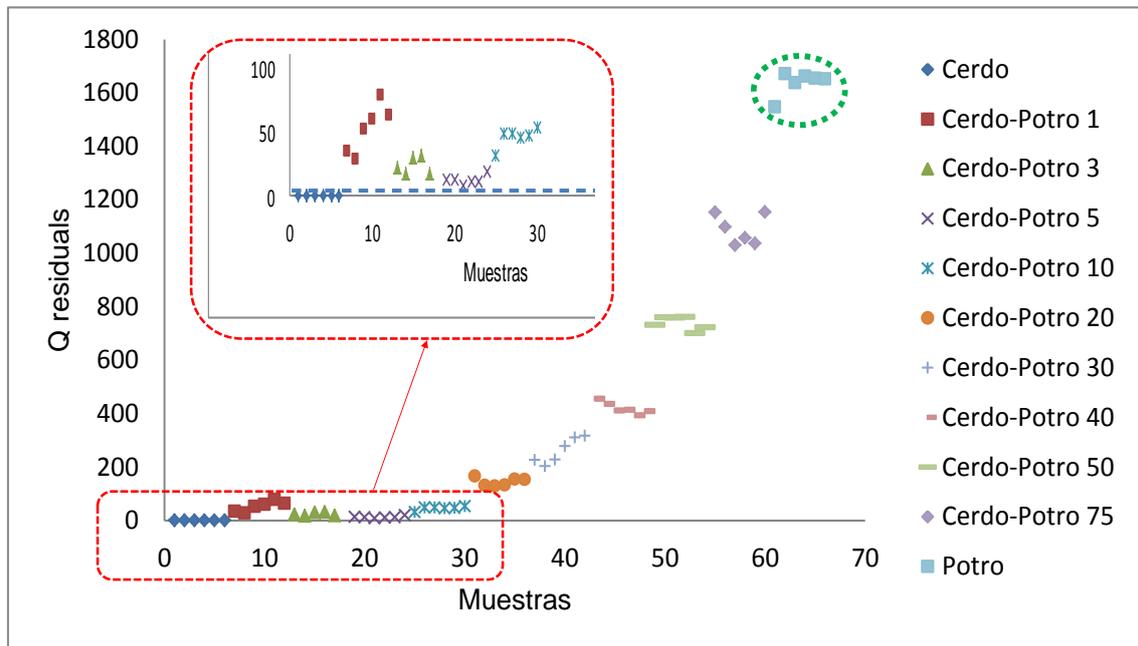


Figura 4. Gráfico de control multivariante con muestras de cerdo y potro puro y sus mezclas

El análisis de las imágenes de las muestras binarias ternera-potro se realizó del mismo modo que las muestras cerdo-potro. Inicialmente se realizó un análisis de PCA el cual mostró, al igual que ocurría para la mezcla cerdo-potro, una varianza acumulada alta (96,26%) si bien en este caso las componentes fueron cuatro, siendo el valor de la primera de 83,95%.

En base a esta agrupación espontánea observada, en función de la cantidad de potro en la mezcla, se procedió a realizar el gráfico de control multivariante de igual forma que en el caso de la mezcla cerdo-potro, pero en este caso el control fue la muestra de ternera 100%. Como se observa en la figura 5 todas las muestras presentaron un valor de Q residuos mayor al valor umbral (línea horizontal discontinua) por lo que en base al resultado todas las muestras quedan diferenciadas de la de ternera 100%, es decir podríamos diferenciar una carne 100% ternera de una que tuviese incorporado un 1% de carne de potro.

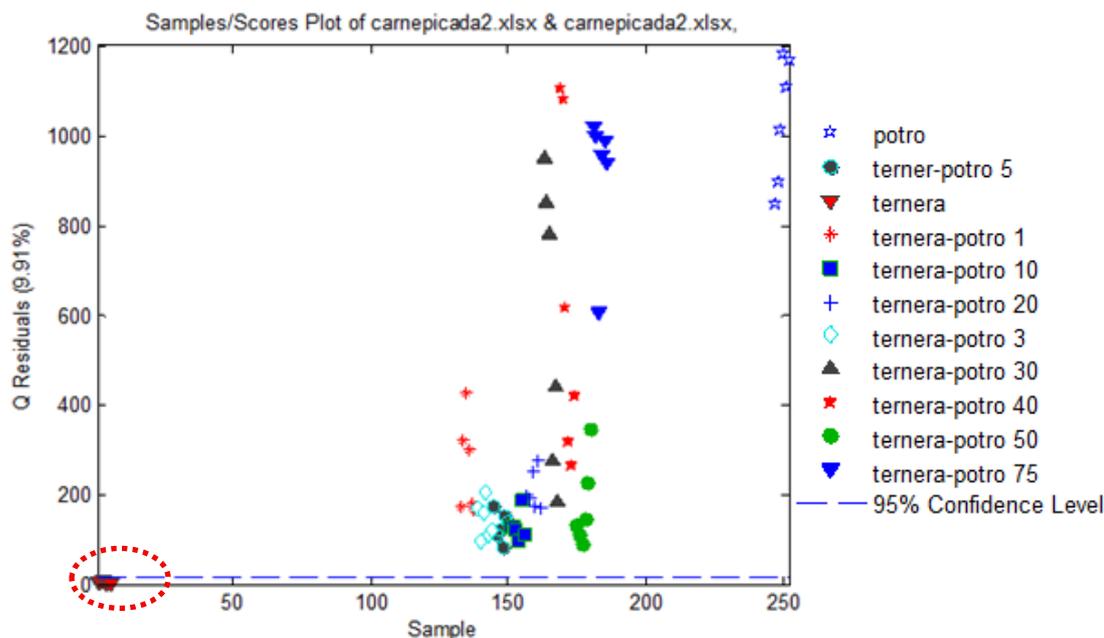


Figura 5. Gráfico de control multivariante con muestras puras y mezclas de ternera y potro.

Con todos estos resultados se puede afirmar que el equipo es capaz de encontrar la presencia de carne de potro en carnes de ternera y cerdo, si bien como anteriormente se ha comentado es necesario ampliar el volumen de muestras y analizar la influencia de factores como tipo de músculo de cada animal, tiempo postmortem, efecto de la congelación, etc, y poder obtener así un modelo no cualitativo como el que se ha obtenido sino uno cuantitativo que pudiese expresar la proporción de carne de potro en la muestra.

Pero una vez se obtuvieron los resultados, tanto de los análisis fisicoquímicos como de los análisis de imagen, se procedió a realizar un estudio que pudiese reflejar la posible relación entre los espectros de imagen obtenidos para las diferentes muestras y los análisis fisicoquímicos realizados. Con el estudio no se pretende obtener un modelo de predicción, si bien es preciso generarlo en el estudio, sino tan solo poder evaluar lo posible dependencia existente. Para tal fin se realizaron análisis de regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS). En la Tabla 3 se muestran los valores que expresan la bondad de los ajustes. Como puede observarse, todas las variables presentaron valores altos de R^2 , si bien los mayores valores se obtuvieron para el pH ($R^2=0,98$) y para el hierro hemo ($R^2=0,92$). En la Figura 6, a modo de ejemplo, se muestra la relación entre los valores medidos para el hierro hemo y los predichos usando el modelo obtenido a partir de la información de imagen. Como se observa, las muestras quedan linealizadas junto a la recta $X=Y$, mostrando la bondad del ajuste y reflejando la dependencia existente entre el espectro y la cantidad de hierro hemo. Si

observamos la Figura 7, en la que se muestran los espectros promedio para los tres tipos de carnes estudiadas, se puede observar cómo se evidencian picos a los 418, 444, 523, 545, 760 y 980 nm. Estos picos están asociados con la mioglobina, grupos hemo y agua. Así la vibración generada a los 418 - 444 nm se asocia con el denominado pico Soret, el cual está asociado a anillos porfíricos de la mioglobina o hemoglobina (Grau et al., 2011; Alamprese et al., 2013; Morsy et al., 2013). Por otro lado las longitudes de onda 523 – 545 nm están asociadas con la banda β , predominante en la oximioglobina (Alamprese et al., 2013). Para estos picos, los valores de absorbancia fueron mayores para la carne de potro, posteriormente para la ternera y finalmente para la de cerdo, coincidiendo con los valores de Fe hemo analizados (Tabla 2). El pico a 760nm está ligado al tercer sobrenoto de los enlaces OH, correspondientes al agua, pero sobre todo a la oxidación de la mioglobina, dado que es el pico que mayoritariamente se asocia a los grupos OH (segundo sobretono), se da a los 980 nm. En este pico, como se observa, los valores de absorbancia obtenidos se ordenan de mayor a menor valor en el siguiente orden; potro, cerdo y ternera, de igual forma que la concentración en agua de las muestras (Tabla 2).

TABLA 3. Información de los PLS de cada variable fisicoquímica estudiada

| | Fe hemo | x^f | x^w | a_w | pH |
|--------------------|-----------|-------------|------------|-----------|----------|
| Num. LVs | 5 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| RMSEC | 1.732 | 0.3954 | 0.333 | 0.001 | 0.004 |
| RMSECV | 1.864 | 0.4024 | 0.339 | 0.001 | 0.004 |
| Bias | 3.55E-14 | -2.66E-15 | 2.84E-14 | -1.11E-16 | 8.88E-16 |
| CV Bias | 0.0196862 | -0.00122338 | 0.00098639 | -7.74E-07 | 2.15E-05 |
| R ² Cal | 0.93 | 0.88 | 0.82 | 0.91 | 0.98 |
| R ² CV | 0.92 | 0.87 | 0.81 | 0.91 | 0.98 |

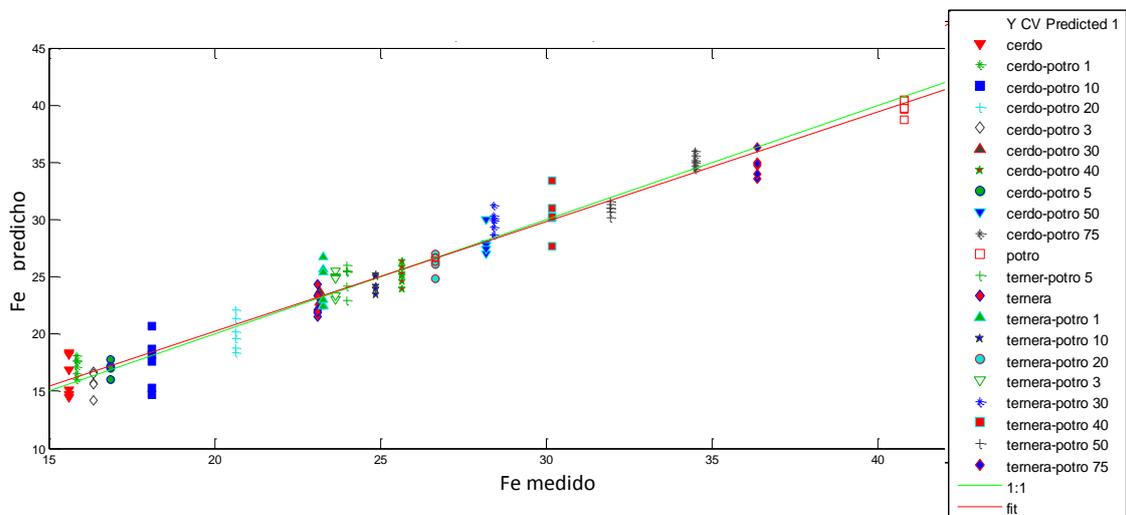


Figura 6. PLS de las muestras puras de potro, ternera y cerdo y sus mezclas.

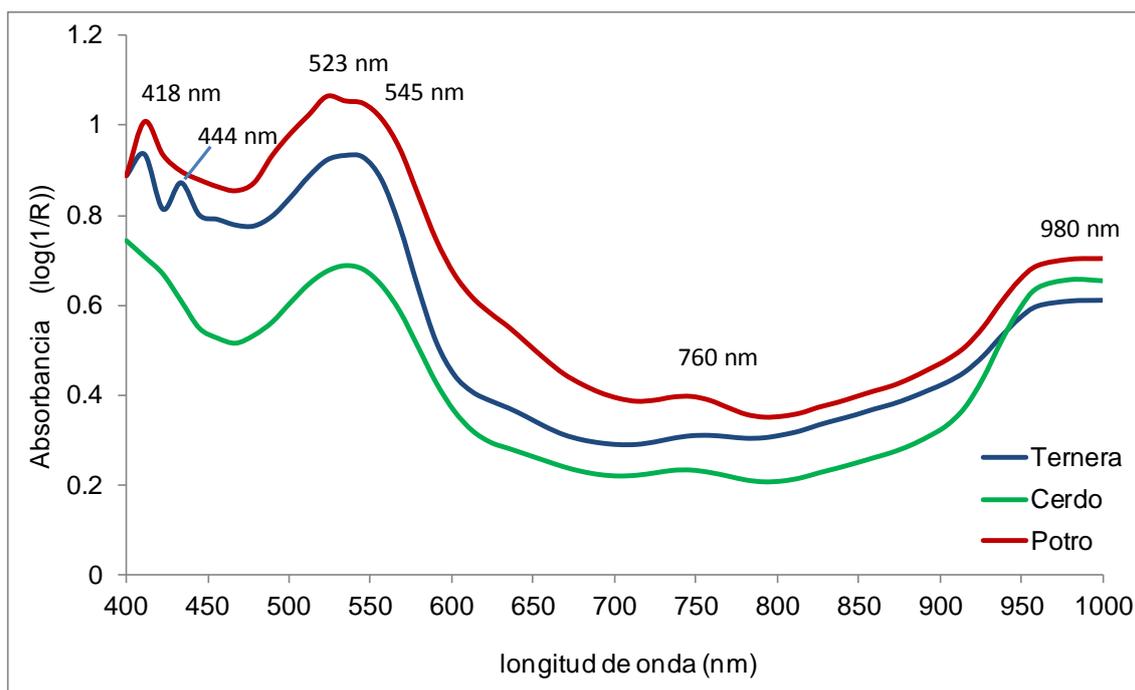


Figura 7. Media de los espectros para las muestras 100% cerdo, ternera y potro.

4. CONCLUSIÓN

Tras llevar a cabo todos los análisis descritos anteriormente, así como el posterior tratamiento de datos, se comprobó que el uso de la técnica de imagen hiperespectral es válida para la detección de la presencia de diferentes tipos de carne en una mezcla cárnica, en especial potro en cerdo o en ternera, con un umbral de detección del 1%. Así los espectros que caracterizan cada muestra han presentado picos característicos que se relacionan directamente con las características fisicoquímicas evaluadas.

Nuevos estudios son necesarios a fin de poder ampliar el número de muestras y evaluar factores como tipo de músculo, tiempo postmortem, etc. a fin de obtener modelos cualitativos y cuantitativos que nos ayuden en la inspección.

5. REFERENCIAS

Alamprese, C; Casale, M; Sinelli, N; Lanteri, S; Casiraghi, E. (2013). Detection of minced beef adulteration with turkey meat by UVevis, NIR and MIR spectroscopy. LWT - Food Science and Technology 53, 225 – 232.

- A.O.A.C., Association of Official Analytical Chemist (1997). Official Methods of Analysis, 16th Ed. Association of Official Analytical Chemist. Arlington, Virginia, USA.
- Ballin, N.Z. 2010. Authentication of meat and meat products. *Meat Science* 86 (2010) 577–587.
- Díaz, ; Cervera, L.; Fenolosa, S; Ávila, C; Belenguera, J. 2011. Hyperspectral system for the detection of foreign bodies in meat products. *Procedia Engineering* 25 (2011) 313 – 316.
- Di Giuseppe, A; Giarretta, N; Lippert, M; Severino, V; Di Maro, A. 2015. An improved UPLC method for the detection of undeclared horse meat addition by using myoglobin as molecular marker. *Food Chemistry* 169 (2015) 241–245.
- Franco, D; Fernández, M; Rodríguez, E; García, L; Lorenzo, J.M. 2011. Calidad de la carne de potro gallego de monte en diferentes explotaciones. *Archivos de zootecnia* vol. 60, núm. 231, p. 390.
- Girón, J; Gil-Sánchez L; García-Breijo E; Pagán MJ; Barat JM; Grau R.. (2015). Development of potentiometric equipment for the identification of altered dry-cured hams: A preliminary study. *Meat Science* 106 (2015) 1–5
- Grau, R; Sánchez, AJ; Girón, J; Iborra, E; Fuentes, A; Barat, JM. (2010). Nondestructive assessment of freshness in packaged sliced chicken breasts using SW-NIR spectroscopy. *Food Research International* 44, 331–337.
- Ivorra, E; Girón, J; Sanchez, A.J; Verdú, S; Barat, J.M; Grau, R. 2013. Detection of expired vacuum-packed smoked salmon based on PLS-DA method using hyperspectral images. *Journal of Food Engineering* 117 (2013) 342–349.
- Kane, D.E; Hellberg, R.S. 2016. Identification of species in ground meat products sold on the U.S. commercial market using DNA-based methods. *Food Control* 59 (2016) 158 e 163.
- Vigni, ML; Durante, C; Foca, G; Marchetti, A; Ulrici, A; Cocchi, M. Near Infrared Spectroscopy and multivariate analysis methods for monitoring flour performance in an industrial bread-making process. *Analytica Chimica Acta* 642 (2009) 69–76
- Lorenzo, J.M; Battle, R.; Gómez, M. 2014. Extension of the shelf-life of foal meat with two antioxidant active packaging systems. *LWT - Food Science and Technology* 59 (2014) 181 e 188.
- Lorenzo, J.M; Gómez, M; Fonseca, S. 2014. Effect of commercial starter cultures on physicochemical characteristics, microbial counts and free fatty acid composition of dry-cured foal sausage. *Food Control* 46 (2014) 382 e 389.
- Lorenzo, J.M; Pateiro, M. 2013. Influence of type of muscles on nutritional value of foal meat. *Meat Science* 93 (2013) 630–638.
- Lorenzo, J.M; Pateiro, M; Franco, D. 2013. Influence of muscle type on physicochemical and sensory properties of foal meat. *Meat Science* 94 (2013) 77–83.
- Ma, F., Qin, H., Shi, K., Zhou, C., Chen, C., Hu, X., Zheng, L. 2015. Feasibility of combining spectra with texture data of multispectral imaging to predict heme and non-heme iron contents in pork sausages, *Food Chemistry* (2015).
- Morsy, N; Sun, D. (2013). Robust linear and non-linear models of NIR spectroscopy for detection and quantification of adulterants in fresh and frozen-thawed minced beef. *Meat Science* 93, 292–302.

- Nache, M; Scheier, R; Schmidt, H; Hitzmann, B. 2015. Non-invasive lactate- and pH-monitoring in porcine meat using Raman spectroscopy and chemometrics. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 142 (2015) 197–205.
- Periódico La Razón. URL <<http://www.larazon.es/sociedad/grecia-halla-adn-de-caballo-en-el-12-5-de-la-IC1895875#.Ttt1KolZSVnHoSW>> [Consulta: 16 de abril 2013].
- Periódico El País. URL <http://sociedad.elpais.com/sociedad/2013/02/25/actualidad/1361787627_327149.html> [Consulta: 20 de marzo 2014].
- Premanandh, J. 2013. Horse meat scandal e A wake-up call for regulatory authorities. *Food Control* 34 (2013) 568 e 569.
- Pretorius, B; Schönfeldt, H.C; Hall, N. 2015. Total and haem iron content lean meat cuts and the contribution to the diet. *Food Chemistry* xxx (2015) xxx–xxx.
- Ramos, A; Cabrera, M.C; Saadoun, A. 2012. Bioaccessibility of Se, Cu, Zn, Mn and Fe, and heme iron content in unaged and aged meat of Hereford and Braford steers fed pasture. *Meat Science* 91 (2012) 116–124.
- Tähkääpää, S; Maijala, R; Korkeala, H; Nevas, M. 2015. Patterns of food frauds and adulterations reported in the EU rapid alert system for food and feed and in Finland. *Food Control* 47 (2015) 175 e 184.
- Terrádez, M. Análisis de Componentes Principales. Proyecto e-Math 10 Financiado por la Secretaría de Estado de Educación y Universidades (MECD).
- Traffano-Schiffo, M.V; Castro-Giraldez, M; Colom, R.J; Fito, P.J. 2015. Study of the application of dielectric spectroscopy to predict the water activity of meat during drying process. *Journal of Food Engineering* 166 (2015) 285–290.
- Verdú S., Ivorra E., Sánchez A.J., Barat J.M., Grau R. (2015). Study of high strength wheat flours considering their physicochemical and rheological characterisation as well as fermentation capacity using SW-NIR imaging. *Journal of Cereal Science* 62, 31-37.
- Wu, D; Sun, D. 2013. Advanced applications of hyperspectral imaging technology for food quality and safety analysis and assessment: A review — Part I: Fundamentals. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 19 (2013) 1–14.
- Wu, D; Sun, D. 2013. Advanced applications of hyperspectral imaging technology for food quality and safety analysis and assessment: A review — Part II: Applications. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 19 (2013) 15–28.
- Yang, X; Youssef, M; O.Gill, C; Badoni, M.2014. Effects of meat pH on growth of 11 species of psychrotolerant clostridia on vacuum packaged beef and blown pack spoilage of the product. *Food Microbiology* 39 (2014) 13 e 18.
- Zajac, A; Hanuza, J; Dyminska, L. 2014. Raman spectroscopy in determination of horse meat content in the mixture with other meats. *Food Chemistry* 156 (2014) 333–338.