



UNIVERSIDAD
POLITECNICA
DE VALENCIA

APLICACIÓN DE LA TÉCNICA DE ESPECTROFOTOMETRÍA DE INFRARROJO CERCANO (SW-NIR) PARA LA DETERMINACIÓN DE LA FRESCURA DE CARNE DE POLLO FILETEADA Y ENVASADA

MASTER EN CIENCIA E INGENIERÍA DE LOS ALIMENTOS

**LUNIER JOEL GIRÓN HERNÁNDEZ
RAÚL GRAU MELÓ
JOSÉ MANUEL BARAT BAVIERA**

INSTITUTO DE INGENIERIA DE ALIMENTOS PARA EL DESARROLLO

APLICACIÓN DE LA TÉCNICA DE ESPECTROFOTOMETRÍA DE INFRARROJO CERCANO (SW-NIR) PARA LA DETERMINACIÓN DE LA FRESCURA DE CARNE DE POLLO FILETEADA Y ENVASADA

Lunier Joel Girón Hernández¹, José M. Barat², Antonio Sánchez³, Raúl Grau².

RESUMEN

En el presente trabajo se pretendió desarrollar una técnica de análisis con la finalidad de evaluar el estado de frescura de carne de pollo fileteada y envasada de forma no destructiva mediante el empleo de un método multiespectral de onda corta que abarca el espectro del infrarrojo cercano (SW-NIR). La experiencia se llevo a cabo durante tres semanas según el proceso que se describe a continuación: (1) preparación de la muestra: se envasaron filetes de pollo en contenedores plásticos y se mantuvieron refrigerados a 4°C. (2) Se realizó captura de imágenes los días 0, 7 y 14 utilizando una cámara capaz de captar imagen en una longitud de onda entre 400-1040 nm para lo que se desarrolló y calibró un sistema de iluminación halógeno. (3) Después de cada captura de imagen, se hicieron determinaciones fisicoquímicas y microbiológicas de Humedad (x^w), actividad de agua (a_w), pH, nitrógeno básico volátil total (N-BVT) y unidades formadoras de colonia (ufc/g) para predecir la degradación bioquímica de las muestras. Los resultados obtenidos mostraron como los parámetros físico-químicos y microbiológicos que mejor explicaron la pérdida de frescura fueron pH, N-VBT y ufc/g con un R^2 de predicción de 0.998. El rango de longitud de onda adecuado para modelizar la frescura de pollo se observó entre los 791 nm y los 859 nm, con un ajuste log (1/R) tiempo de almacenamiento de $R^2 = 0.952$. Además el parámetro fisicoquímico que mejor expresó la relación entre los datos multiespectrales de imagen y el tiempo fue el pH. En base a estos resultados, la técnica de espectrofotometría de infrarrojo cercano (SW-NIR) puede ser una herramienta en el control de la frescura de la carne de pollo fileteada y envasada, aunque son necesarios sucesivos estudios a fin de profundizar en la técnica y obtener una herramienta totalmente fiable y aplicable al sector.

RESUM

En aquest treball es va pretendre desenvolupar una tècnica d'anàlisi amb la finalitat d'avaluar l'estat de frescor de filets de carn de pollastre envasada de forma no destructiva per mitjà de l'ús d'un mètode multiespectral d'ona curta que comprén l'espectre de l'infraroig pròxim (SW-NIR). L'experiència es va

¹Instituto de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo (Iu-IAD).

²Grupo de Investigación e Innovación Alimentaria (CUINA). Dto. Tecnología de Alimentos.

³Institut d'Automàtica e Informàtica Industrial (ai2).

dur a terme durant tres setmanes segons el procés que es descriu a continuació: (1) preparació de la mostra: es van envasar filets de pollastre en contenidors plàstics i es van mantindre refrigerats a 4°C. (2) Es va realitzar captura d'imatges els dies 0, 7 i 14 utilitzant una càmera capaç de captar imatge en una longitud d'ona entre 400-1040 nm per al que es va desenvolupar i va calibrar un sistema d'il·luminació halogen. (3) Després de cada captura d'imatge, es van fer determinacions fisicoquímiques i microbiològiques d'Humitat (x^w), activitat d'aigua (a_w), pH, nitrogen bàsic volàtil total (N-BVT) i unitats formadores de colònia (ufc/g) per tal de predir la degradació bioquímica de les mostres. Els resultats obtinguts van mostrar com els paràmetres fisicoquímics i microbiològics que millor van explicar la pèrdua de frescor van ser pH, N-VBT i ufc/g amb un R^2 de predicció de 0.998. El rang de longitud d'ona adequat per a modelitzar la frescor de pollastre es va observar entre els 791 nm i els 859 nm, amb un ajust log (1/R) – temps d'emmagatzemament, de $R^2 = 0.952$. A més el paràmetre fisicoquímic que millor va expressar la relació entre les dades multiespectrals d'imatge i el temps va ser el pH. Basant-se en aquests resultats, la tècnica d'espectrofotometria d'infraroig pròxim (SW-NIR) pot ser una eina en el control de la frescor de la carn de pollastre filetejada i envasada, encara que són necessaris nous estudis a fi d'aprofundir en la tècnica i obtenir una eina totalment fiable i aplicable al sector.

ABSTRACT

A technique to predict chicken meat freshness, which is measured nondestructively by short-wavelength near infrared (SW-NIR) spectroscopy, was developed. The experiment was conducted over 3 weeks in the following steps: (1) Sample preparation: slices of breast muscle of broiler chicken were packed in plastic containers and stored at 4° C. (2) The near infrared spectra were recorded on days 0, 7 and 14 by a camera working in the wavelength range of 400-1040 nm using a halogen flood lighting system that was developed and calibrated. (3) After image generation, the determination of physico-chemical and microbiological properties such as Dry matter (DM), water activity (a_w), pH, total basic volatile nitrogen (T-VBN) and colony forming units/g (cfu/g) were done to predict the biochemical degradation of the samples. (4) Finally, the development of an equation to correlate the physico-chemical and microbiological data with the infrared spectra data was obtained to predict the freshness of chicken meat. The physico-chemical and microbiological variables that explain the loss of freshness were pH, T-VBN, and cfu/g were predicted with a R^2 of prediction of 0.998. The optimal wavelength range for modeling freshness score involved a start wavelength of 791 nm and an end wavelength of 859 nm. This result could indicate that spectral imaging can be used as a tool for the prediction of freshness with a R^2 of prediction of 0.952. Further studies are needed in order to accurate the SW-NIR technique for predicting chicken meat freshness.

PALABRAS CLAVE: Espectrofotometría, SW-NIR, Frescura, Pollo, Envasado, Calidad.

INTRODUCCIÓN

El término frescura resulta bastante ambiguo cuando se hace referencia a los productos cárnicos y de la pesca. En la actualidad no existe una metodología que permita determinar el grado de frescura de una carne, sino que son el compendio de diferentes pruebas, las que de forma no legislada, orientan sobre el grado de frescura de ésta. En conjunto estas pruebas se basan en la realización de una serie de determinaciones sensoriales, químicas y microbiológicas (In-Seon Park *et al.*, 2000; Kaneki *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2008). Este tipo de pruebas tienen varias limitaciones: la evaluación sensorial es un método subjetivo, cuyos resultados dependen de las habilidades naturales de los jueces y los métodos microbianos, aun siendo más objetivos, necesitan de 2 a 3 días para su determinación. En cambio, en la actualidad, los análisis químicos, tales como Nitrógeno básico volátil total (N-BVT), pH, Cloruro de trifeniltetrazolio (TTC), actividad de agua (a_w) y humedad (x^w), son ampliamente utilizados para determinar la frescura; pero, el tiempo necesario para su realización y que ninguno de ellos sea un indicador contrastado hace que estos análisis químicos no supongan una herramienta definitiva en la determinación de la frescura de un producto tan perecedero como es la carne fresca. Sin embargo, en pescado, el N-BVT ha sido utilizado tradicionalmente como indicador (Huidobro y Tejada, 1990).

En la actualidad, el auge de demanda de productos fileteados o cortados en lonchas y envasados supone un incremento en la manipulación de la carne y productos cárnicos para darle a éstos el formato necesario para su comercialización favoreciendo, de este modo, la pérdida de frescura de la carne y derivados.

La primera empresa española productora de fileteados cárnicos produjo 140 millones de bandejas y facturó 443 millones de € en 2007 (Alimarket, octubre 2007). Por tanto, la importancia del sector de los loncheados cárnicos y de las distribuidoras de alimentos, con volúmenes de ventas (en productos cárnicos fileteados o en lonchas y envasados) de 11.286 millones de € en 2006 (Alimarket, octubre 2007), que basan su estrategia en este formato de venta, hacen necesaria la obtención de métodos analíticos que puedan definir de una forma concreta el grado de frescura de la carne y que además puedan realizarlo teniendo en cuenta el sistema de venta utilizado.

En este sentido, diferentes investigaciones se han dirigido a la obtención de técnicas no destructivas para la evaluación de factores de calidad internos y externos de los alimentos. Una de ellas es el análisis de imagen, donde se incluye el análisis de resonancia magnética nuclear (NMR) (Chen *et al.*, 1989; McCarthy, 1994), el análisis de resonancia magnética (MRI), el análisis de rayos-X y el análisis de espectroscopía en el infrarrojo cercano (SW-NIR) (Osborne, 2000), como técnicas para caracterizar la composición química, los fenómenos de transferencia de agua en carne o el contenido en grasa en carne de cerdo, entre otros (Laurent *et al.*, 2000; McFarlane *et al.*, 2003; Ruiz-Cabrera *et al.*, 2004; Monziols *et al.*, 2006). La principal ventaja del uso de las técnicas NMR, MRI y rayos-X es la posibilidad de adquirir imágenes del interior del producto. Sin embargo, su elevado

coste, su dificultad para aplicarlos en trabajos “online” y, en algunos casos, los riesgos asociados a su empleo (p.e. en el caso de las imágenes por rayos-X) hacen que la aplicación de estas tecnologías sea complicada (Dah-Jye Lee *et al.*, 2008). Sin embargo, la técnica de visión multispectral de infrarrojo cercano (SW-NIR) se posiciona desde los últimos años como una de las principales tecnologías alternativas para el análisis de compuestos biológicos (Di Wu *et al.*, 2008).

La espectroscopia de infrarrojo cercano (SW-NIR) se basa en la absorción electromagnética de un haz de luz comprendido en el rango de longitudes de onda que va desde los 780 a los 2500 nm, en alimentos. El espectro del NIR se genera mayoritariamente por vibraciones producidas en forma de sobretonos que resultan de los enlaces químicos entre C-H, O-H y N-H como consecuencia de la incidencia del haz de luz. Los enlaces químicos presentes entre las moléculas generan una vibración que se comporta como un movimiento armónico simple. El movimiento de cada átomo puede ser tratado como una vibración independiente con respecto a un centro fijo de la masa de la molécula y no como una masa sujeta a un resorte. La frecuencia de la vibración es función de la masa de los dos átomos y de la fuerza de atracción entre ellos y hay una relación parabólica entre la energía potencial y la distancia inter atómica. Cuando la frecuencia de la radiación con la frecuencia de la molécula que vibra se genera una transferencia neta de energía proveniente de la radiación de la molécula, la cual puede ser medida y graficada como energía versus longitud de onda. Esta medida se conoce como el espectro (Osborne, 2000).

Existen tres clases distintas de dispositivos que captan señal infrarroja. Los espectrómetros monocromados, los de matriz de diodos y los de filtro. Los espectrómetros monocromados poseen un detector de silicio que percibe longitudes de onda entre los 400 a 1100 nm y pueden ser utilizados en modo de reflectancia o transmitancia. A esta parte del espectro se le conoce como “short-wavelength near-infrared” (SW-NIR). Dependiendo de la clase de detector que empleen los terminales monocromados, podrán recibir información de una parte o todo el espectro infrarrojo. Los espectrómetros de matriz de diodos cubren el rango de 400 a 1700 nm y se caracterizan por ser bastante rápidos y los dispositivos de filtro los cuales están equipados de 6 a 20 filtros les permiten hacer análisis de absorción (Osborne, 2000). Este tipo de terminales son los utilizados por la industria láctea para la determinación de humedad, grasas, proteínas y lactosa entre otras (Bjarno, 1982). Finalmente se encuentran aquellos que trabajan a longitudes de onda entre los 1100-2500 nm los cuales se denominan “long-wavelength near-infrared” (LW-NIR). Si bien el espectro que se puede obtener con estos últimos es mucho mayor, la ventaja de la utilización de la región del SW-NIR se basa en que permite que la energía NIR penetre más profundamente en una muestra con una menor generación de calor que el que se generaría utilizando la región de onda larga del infrarrojo cercano (LW-NIR) lo cual reduce la interacción muestra método de análisis (Di Wu *et al.*, 2008).

En la actualidad se dispone de pocas investigaciones sobre esta técnica en alimentos. Algunas de ellas van encaminadas a la determinación de grasa, proteína y lactosa en leche (Sasic y Ozaki, 2001), contenido de

azúcar en yogurt (He *et al.*, 2007), determinación del momento de cosechado del mango (Subedi *et al.*, 2007), así como estudios en cereales, patata y en parámetros relacionados con la humedad en productos cárnicos y pescado ahumado (Dah-Jye Lee *et al.*, 2008), aunque la mayoría de estos estudios son preliminares y en ningún caso están enfocados al estudio de la calidad sanitaria o fresca.

Así en el presente trabajo se planteo como objetivo el desarrollar la aplicación de la espectroscopia de infrarrojo cercano (SW-NIR) como método no destructivo de determinación de la frescura de carne de pollo fileteada y envasada.

MATERIALES Y MÉTODOS

Selección y preparación de muestras.

La materia prima utilizada fue pechuga de pollo sin piel. Las muestras fueron adquiridas de un supermercado local, las cuales procedían de animales de 24 horas postmortem.

Con la finalidad de tener muestras de forma y tamaño aproximado, las pechugas fueron fileteadas y envasadas en bandejas de plástico de 14 cm por 11 cm adaptadas con una base en la que se suspendía la muestra (figura 1). Las muestras tenían un tamaño similar a la superficie de la bandeja, siendo las dimensiones de los filetes aproximadamente de 5 cm de ancho, 8 cm de largo y 2 cm de alto. Las bandejas se sellaron con film plástico, obteniendo una atmosfera con un 8% de vacío. Durante toda la experiencia las muestras envasadas permanecieron a 4°C.

La toma de muestra se realizó a tiempo 0 (día de compra y envasado), a los 7 días del envasado (aproximadamente igual al tiempo de vida útil que se le da a este tipo de producto) y a los 14 días.

Los análisis realizados fueron: captura de imagen mediante infrarrojo cercano realizada sobre el producto envasado y tras ser desenvasado, y análisis destructivos de humedad (x^w), actividad de agua (a_w), pH, nitrógeno básico volátil total (N-BVT), y unidades formadoras de colonias de anaerobios totales (ufc/g). Todos los análisis fueron realizados por triplicado.

Análisis Físico-químico y microbiológico

HUMEDAD (x^w)

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 (J.P. Selecta, S. A., Barcelona, España) a $103 \pm 2^\circ$ 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:

$$\% \text{humedad} = \frac{m_1 - m_2}{m_1 - m_0} \cdot 100 \quad (1)$$

donde:

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)

ACTIVIDAD DE AGUA (a_w)

Para la determinación de la actividad de agua se utilizó el equipo Aqualab GB-X modelo Fast-Lab (GBX, Romans-sur-Isère, France), 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.

pH

El pH se midió con un pH-metro portátil MM40 (Crison Instruments S. A, Alella, Barcelona, España). Para ello, se tomó 10 g de producto y 90 mL de agua destilada y se homogenizó la muestra con un Ultra-Turrax T25 (IKA Labortechnik, Staufen, Alemania) antes de hacer la lectura (Fuentes, 2008).

NITRÓGENO BÁSICO VOLÁTIL TOTAL (N-BVT)

El contenido de N-BVT se determinó según los procedimientos descritos por Malle y Tao (1987). Para medir el N-BVT se homogenizó en Ultra-Turrax T25 (IKA Labortechnik, Staufen, Alemania) 40 g de muestra, previamente triturada, con 80 mL de una disolución acuosa de ácido tricloroacético (7,5% p/v) durante 1 min. Este homogenizado se centrifugó a 4500 rpm durante 20 min y el sobrenadante fue filtrado a través de papel filtro Whatman nº 1, obteniéndose así el extracto de la muestra. En un tubo de destilación tipo Kjeldahl, se introdujeron 25 mL del filtrado obtenido y 5 mL de una disolución acuosa de NaOH (10% p/v). Los tubos se llevaron a una unidad de destilación PRO-NITRO M (Selecta, S. A., Barcelona, España) y el destilado fue recogido sobre 15 mL de una disolución acuosa de ácido bórico (4% p/v). Finalmente, la disolución obtenida se valoró con ácido sulfúrico

0,01 N, utilizando Shiro T-Shiro como indicador. Los resultados de expresaron en mg de N-VBT/100 g de producto.

$$\text{mg N/100g muestra} = \frac{N_{\text{H}_2\text{SO}_4} \cdot f \cdot (V_m - V_b) \cdot (80 + (m \cdot H)) \cdot 14}{m \cdot 25} \cdot 10^5 \quad (2)$$

donde:

$N_{\text{H}_2\text{SO}_4}$ = normalidad del ácido sulfúrico

f = factor de normalidad del ácido sulfúrico

V_m = volumen de ácido sulfúrico empleado en la valoración de la muestra (L).

V_b = volumen de ácido sulfúrico empleado en la valoración del blanco (L).

m = masa de la muestra (g)

H = contenido de humedad de la muestra (g agua/muestra).

MICROORGANISMOS AEROBIOS MESÓFILOS (ufc/g) (Norma ISO4833, 2003)

Mediante este recuento se estimó la flora total del producto sin especificar el tipo de gérmenes. Para ello se utilizó el método de recuento por siembra en masa. Las muestras se pusieron en Stomacher durante 2 minutos en una proporción de 1:9 en agua de peptona tamponada (Scharlau Chemie S.A., Barcelona, España) haciéndose posteriormente series de disoluciones decimales para cada muestra. 1 mL de cada disolución decimal se depositó en placas de cultivo a las que se agregó una disolución de medio de cultivo Plate Count Agar (PCA) (Scharlau Chemie S.A., Barcelona, España). Los recuentos de colonias se hicieron después de haber incubado las placas durante 72 horas a $31 \pm 1^\circ\text{C}$.

Análisis de imagen.

CAPTURA DE IMAGEN

Para realizar la captura de imágenes, las bandejas se ubicaron en una cinta transportadora en la que previamente 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 multiespectral lineal que abarca desde el rango visible hasta el infrarrojo cercano, con un rango de 400 a 1040 nm de longitudes 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 fueron constantes para obtener el mismo tamaño de imágenes. Se dejaron 18 cm de distancia entre el iluminante y la muestra y de 40 cm entre las muestras y la cámara. Sobre cada una de las muestras se capturaron dos imágenes (figura 1),

haciendo que las líneas siempre fueran las mismas (entre tiempo 0 y tiempo 7 ó 14 días), para lo cual se definieron dos puntos de lectura por bandeja.

Las imágenes así capturadas representaron la reflectancia de luz para cada zona y muestra (n=15). Esta reflectancia se obtiene como consecuencia de que el iluminante irradia la muestra, con lo que parte de la radiación se difunde en forma de calor tanto al ambiente como en la muestra, mientras que la radiación restante es reflejada por la propia muestra, siendo captada por la cámara y representada en una escala de blanco y negro con 256 tonos de grises entre blanco y negro. Con la finalidad de eliminar la influencia de la luz, se capturó una imagen de un patrón blanco, para cada día de captura de imagen y bajo las mismas condiciones de captura de imagen.

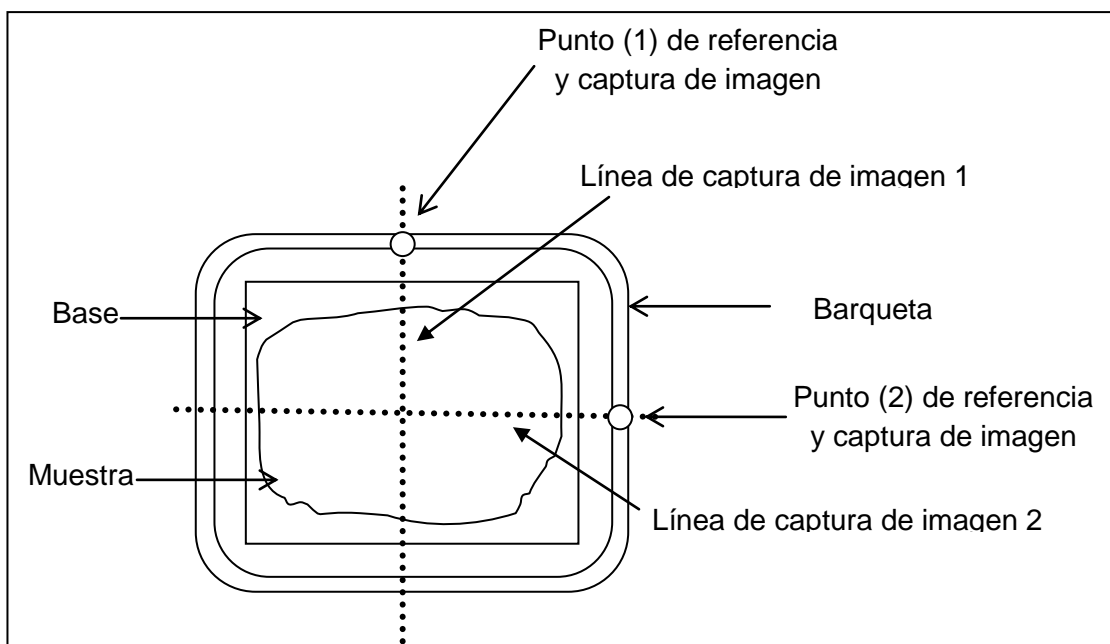


Figura 1. Representación del montaje para la captura de imágenes y almacenamiento de muestras

ANÁLISIS DEL ESPECTRO

Para el tratamiento de las imágenes y la extracción de datos se utilizó el programa Matlab (The Mathworks, Natick, Massachussets, USA). Una vez obtenidas las imágenes y con el fin de generar el espectro, se seleccionó un área central de estudio, estandarizando así la zona de estudio para cada una de las muestras. Sobre cada una de estas aéreas se calculó la reflexión para cada longitud de onda, siendo el espectro de la muestra el conjunto de valores de reflexión de ésta para todas las longitudes de onda evaluadas. Con la finalidad de reducir las diferentes intensidades luz del foco iluminante, que se dan a diferentes longitudes de onda, se aplicó un filtrado. Una vez normalizados los espectros, se calculó la inversa de su logaritmo y se le aplicó una función de ajuste al entero más cercano para mejorar su visualización.

Análisis estadístico

Se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) para evaluar las diferencias en los parámetros físico-químicos y microbiológicos, entre los diferentes días de análisis. Se consideraron como variables dependientes cada uno de los atributos evaluados y como factor el tiempo (días).

El análisis de regresión múltiple se utilizó para describir la relación de las cinco variables evaluadas respecto al tiempo, siendo el nivel de significación establecido de $\alpha=0,05$.

Con la finalidad de evaluar el efecto del film de envasado sobre la medida espectrofotométrica se realizó un análisis estadístico de los componentes principales (PCA) teniendo en cuenta la variable film así como el tiempo en el que se tomó la muestra. La selección del rango de longitud de onda adecuado a fin de observar las diferencias entre los espectros para cada tiempo de toma de muestra se realizó mediante el análisis discriminante que calculaba la distancia de Mahalanobis para eliminar los valores atípicos (Meulemans *et al.*, 2002).

La correlación entre las franjas de los espectros seleccionados con el tiempo así como con las variables fisicoquímicas y microbiológicas se llevó a cabo aplicando una regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS).

Los análisis estadísticos se realizaron mediante el programa SPSS 16.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Determinación físico-química y microbiológica (análisis destructivo).

La tabla 1 muestra los valores promedio y error estándar de las determinaciones fisicoquímicas y microbiológicas realizadas sobre las muestras de pechuga pollo fileteada y envasada durante 0, 7 y 14 días a 4°C. Para todos los parámetros evaluados a excepción de la humedad (x^w), existió interacción significativa ($P<0.05$) entre la muestra y el tiempo de muestreo por lo que se procedió a evaluar la influencia del tiempo de muestreo. En el caso de la humedad, aunque no existió una variación significativa de sus valores con el tiempo de permanencia en refrigeración, sí se observó un descenso paulatino de dichos valores, como consecuencia del exudado que se genera como resultado de la acción enzimática (sistema calpaínico) sobre las proteínas (Huff-Lonergan y Lonergan, 2005; Zhang *et al.*, 2005).

Tabla 1. Media \pm error estándar (se), y (P-value) para los valores de las determinaciones fisicoquímicas y microbiológicas en las muestras de pollo a los 0, 7 y 14 días de almacenamiento.

Tiempo	$x^w \pm se$	$a_w \pm se$	pH $\pm se$	NVBT (mg/100g) $\pm se$	log ufc/g $\pm se$
0	75,05 \pm 1,33a	0,988 \pm 0,00a	5,90 \pm 0,00a	18,66 \pm 0,10a	4,92 \pm 0,01a
7	74,96 \pm 0,02a	0,986 \pm 0,00a	6,10 \pm 0,00b	27,28 \pm 3,57b	5,63 \pm 0,26b
14	72,62 \pm 0,08a	0,991 \pm 0,00 b	6,17 \pm 0,00c	38,74 \pm 0,35c	8,07 \pm 0,05c

Valores con letras diferentes difieren significativamente para $P \leq 0.01$

Los valores de actividad del agua en las muestras de pollo se mantuvieron constantes durante la primera semana del ensayo. Sin embargo, este valor se incrementó significativamente ($P < 0.05$) a los 14 días, pasando de valores de 0,986 a 0,991. El aumento pudo deberse a la acción enzimática sobre las proteínas la cual reduciría la capacidad de retención de agua (Huff-Lonergan y Lonergan, 2005; Zhang *et al.*, 2005) y por consiguiente incrementar ligeramente los valores de a_w .

El N-BVT, es un parámetro que está regulado por la Comunidad Económica Europea (CEE, 2005) para algunas especies de pescado entre las que se destacan el *Salmo salar* y las especies pertenecientes a la familia de los *Pleuronectidae* (excepto fletán), *Merlucciidae* y *Gadidae*, entre otros. El pollo es un producto que no entra dentro de la regulación de la CEE, sin embargo, los valores adquiridos permitieron obtener información sobre los cambios bioquímicos ocurridos durante el almacenamiento de este producto. Los resultados mostraron como las muestras incrementaron significativamente los valores de N-BVT a lo largo del tiempo ($P < 0.05$), duplicándose en 14 días el contenido inicial (Tabla 1). En base a este resultado y tomando como limite el establecido para pescado (30 mg/100g), se podría decir que a los 14 días de almacenamiento en las condiciones de la experiencia, el producto ya no sería viable para el consumo humano. Valores similares han sido encontrados por otros autores (Economou *et al.*, 2009).

Los valores de pH en las muestras de pollo incrementaron su valor inicial de 5,9 a un valor final de 6,17. Los datos obtenidos para los valores del día 0 fueron ligeramente superiores a los descritos por diferentes autores (de Fremery y Lineweaver, 1962; Stewart *et al.*, 1984; McGinnis *et al.*, 1989), quienes describen que después del sacrificio del animal, y a medida que el ácido láctico se acumula, el pH muscular desciende desde valores de 7,1 a valores de 6,0-5,9 después de 2 y 3 horas post mortem en el músculo rojo de las patas, mientras que el pH del músculo blanco de la pechuga puede continuar disminuyendo más allá de las 24 horas hasta alcanzar valores de 5,6-5,4 (Richardson y Mead 2001). El incremento de pH respecto al valor del día 0, durante la experiencia, pudo deberse a la disminución de la disociación de electrolitos y un aumento en la formación de amoníaco (Ko *et al.*, 2005; Chun *et al.*, 2009).

El análisis microbiológico mostró como aumentó significativamente ($P < 0.05$) el número de colonias mesófilas ($\log(\text{ufc/g})$) con el tiempo de almacenamiento a una temperatura de 4°C , siendo los datos para día 0 ($4,92 \pm 0,01$) y día 7 ($5,63 \pm 0,26$) inferiores a 10^{-6} ufc/g. Aunque la legislación española no menciona límites para bacterias aerobias mesófilas en carne de aves (CEE, 2007), distintos autores aconsejan límites orientativos en base a los cuales se puede clasificar la calidad de la carne. Así, con valores inferiores a 10^{-6} ufc/g supondría tener un producto de buena calidad (Pascual y Calderón, 2000), con valores entre 10^{-6} y 10^{-7} un producto de calidad aceptable y valores superiores a 10^{-7} un producto de calidad inaceptable (Smolander *et al.*, 2004). En base a estos criterios, las muestras analizadas dejaría de ser viable antes de los 14 días, dado que se alcanzaron valores de 10^{-8} ufc/g. Según Smolander *et al.*, 2004 la fecha límite para alcanzar dicho valor sería de 12 días.

Con la finalidad de expresar la correlación existente entre los parámetros de los análisis destructivos con el tiempo de almacenamiento a 4°C se procedió a realizar una regresión lineal. Como se observa en la ecuación (3) existiendo una muy buena correlación ($R^2=0.998$) entre el tiempo de almacenamiento y los parámetros de pH, ufc/g y N-BVT.

$$\text{Tiempo} = -237,266 - 0,172026 \cdot \text{NBVT} + 2,543 \cdot \log \text{ ufc/g} + 38,6232 \cdot \text{pH} \quad (3)$$

Análisis de imagen (análisis no destructivo).

Una vez realizada la adquisición de las imágenes y después de su tratamiento se obtuvieron los espectros ($\log(1/R)$) para cada imagen. Los espectros fueron clasificados según el día de toma de muestras (imagen) y en base a la presencia y ausencia del film de envasado, es decir, a si las imágenes fueron capturadas antes o después de que las muestras de pollo fueran desenvasadas.

El análisis estadístico de los componentes principales (PCA) (figura 2) mostró que un hubo efecto del film de envasado sobre los valores de intensidad de señal. Este resultado pone en evidencia que la herramienta SW-NIR podría ser utilizada para analizar productos envasados sin la necesidad de ser desenvasados para su análisis. Resultados similares fueron encontrados por Isaksson *et al.*, 1992, quienes reportaron que en carne vacuna picada envuelta en film plástico la transmitancia del infrarrojo cercano no se vio significativamente influenciada por la presencia de un film, además de no presentarse cambios obvios en la estructura del polímero cuando este se encuentra en contacto con la muestra.

Por otro lado si bien el factor 1, el cual explicó el modelo en un 98.7 %, no diferenció entre los diferentes tiempos de toma de muestra, el factor 2 con un 1.3 % sí reflejó la posible capacidad que podría tener la información obtenida en los espectros en base a poder ser usada como herramienta para determinar el tiempo de envasado.

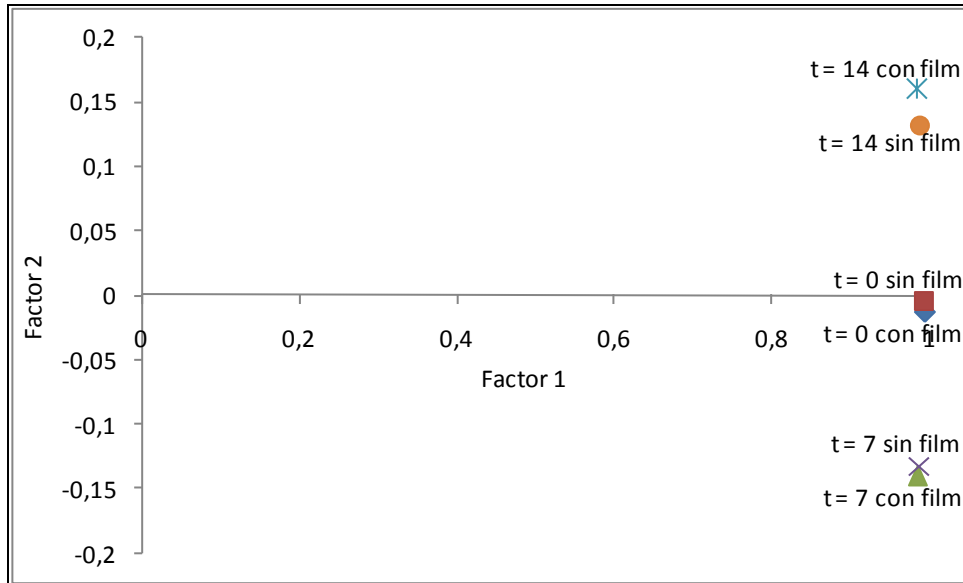


Figura 2. Análisis de componentes principales (PCA) para las muestra evaluadas con y sin film de envasado durante todo el periodo en estudio.

Con la finalidad de filtrar la información obtenida por los espectros de las imágenes para cada tiempo de envasado en el que se tomaron las imágenes (figura 3) y obtener un rango de longitudes de onda con las que se pudiese diferenciar de forma estadística el tiempo de envasado, se procedió a realizar un análisis discriminante que utiliza la distancia Mahalanobis (Ripoll *et al.*, 2008). Mediante esta herramienta estadística se determinó que el rango de longitud de onda que diferencia las muestras en función del tiempo, fue el comprendido entre los 791 nm y los 859 nm. La Figura 4, muestra los tres grupos diferenciados con longitudes de onda entre los 791 y los 859 nm, siendo el factor 1 en un 99% el que explicó dicha diferenciación.

A partir de estos resultados y teniendo en cuenta la relación existente entre la información recibida por los datos de imagen y el tiempo de envasado de la muestra se buscó una relación matemática mediante la que se explicase dicha relación. Para ello se realizó una regresión lineal (ecuación 4) la cual presentó un ajuste de un $R^2=0.952$.

$$\text{Tiempo} = 38.8164 - 168.83 \cdot \log(1/R^{(791-859)}) \quad (4)$$

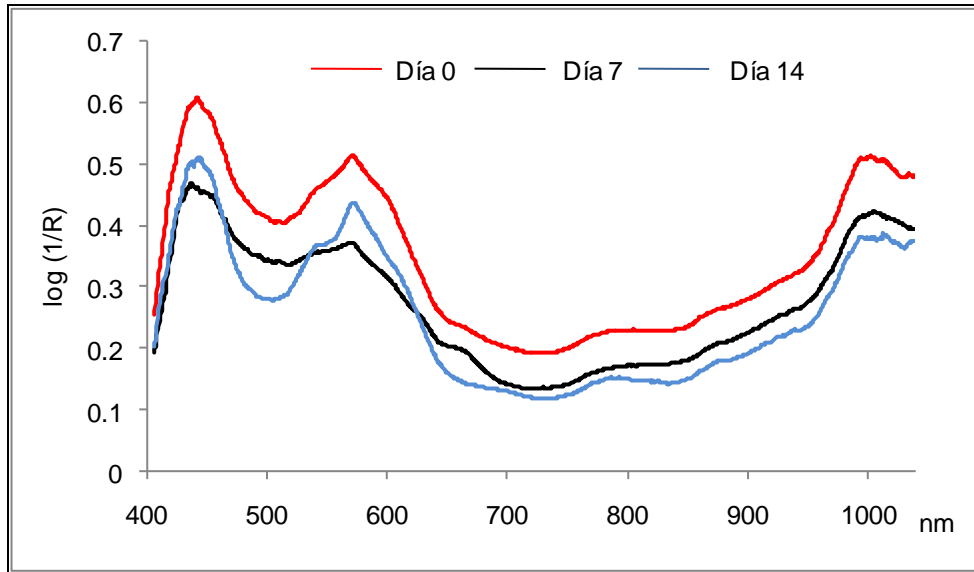


Figura 3. Espectro de reflectancia ($\log(1/R)$) de las muestras durante el periodo en estudio.

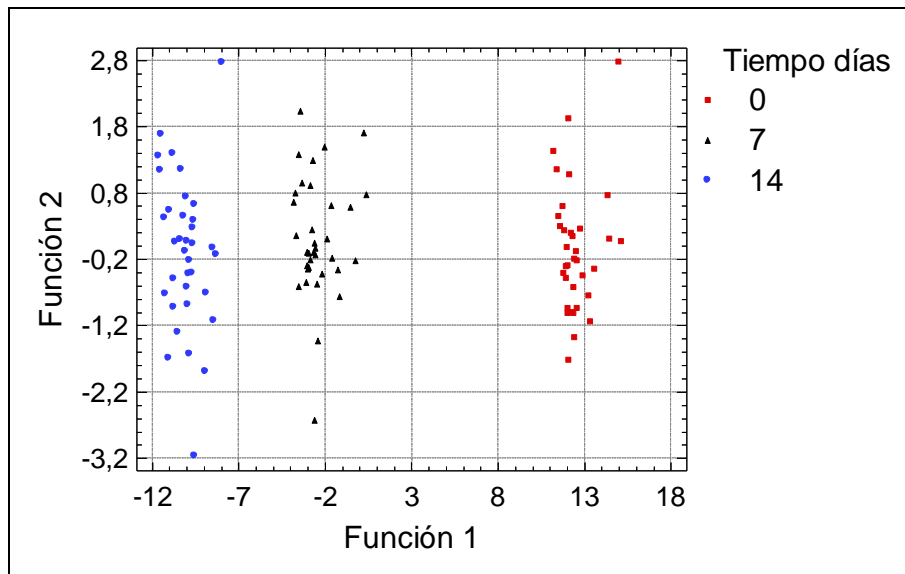


Figura 4. Representación de los grupos obtenidos mediante el método discriminante.

Correlación entre el análisis de imagen (análisis no destructivo) y los análisis fisicoquímicos y microbiológicos (análisis destructivos).

Para estudiar la relación de la variación del espectro a lo largo del periodo de almacenamiento con la variación a lo largo del tiempo de los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos se realizó un análisis estadístico mediante el método de regresión de cuadrados mínimos parciales (PLS). De

los cinco parámetros evaluados (Tabla 2), el pH, el N-BVT y las ufc/g fueron los que mejor explicaron el comportamiento de la imagen en relación con el tiempo ($P < 0.01$). Además, estos tres parámetros están relacionados entre ellos. Durante el proceso en el que la carne de pollo va perdiendo frescura, se produce un incremento de los microorganismos presentes en ella (Smolander *et al.*, 2004) (Tabla 1), los cuales incrementan el nivel de N-BVT (Economou *et al.*, 2009) (Tabla 1) el cual está formado por sustancias alcalinas que conllevan a un aumento del pH (Ko *et al.*, 2005; Chun *et al.*, 2009). Aunque esta relación causa-efecto, que explicaría de forma detallada como se degrada la carne de pollo envasada, no es utilizada como indicador, si puede servir de guía dado que otros productos como en el pescado (con mayor formación de N-BVT) sí es utilizada.

Al aplicar una técnica de regresión lineal con los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos influyentes, se obtuvo la ecuación (5) que relaciona la señal espectrofotométrica con dichos parámetros con un $R^2 = 0.929$. Similares comportamientos fueron encontrados por otros autores los cuales trabajando a longitudes de onda mucho mayores y observaron relaciones entre los cambios espectrales en productos cárnicos y de la pesca y la pérdida de frescura relacionada con el crecimiento microbiano (Ellis *et al.* 2002; Lin *et al.*, 2004; 2006; Horváth *et al.*, 2008).

$$\log(1/R^{(791-859)}) = -329301 + 2110,87 \cdot \log \text{ ufc/g} - 256,107 \cdot \text{NBVT} - 371,949 \cdot \text{pH} \quad (5)$$

Tabla 2. Factores utilizados para generar el modelo, valor de correlación (%) y (P-value) de los diferentes factores de regresión lineal por cuadrados mínimos parciales.

Componente	R ²	P-Valor
Tiempo	0,952	0,000
pH	0,969	0,000
N-BVT	0,831	0,000
Log ufc/g	0,549	0,000
X ^w	0,327	0,107
a _w	0,229	0,192

Conclusiones

La pérdida de frescura de la carne de pollo fileteada y envasada, se ha relacionado con un incremento del pH, de los compuestos N-BVT y de la proliferación de microorganismos (ufc/g).

El espectro de las imágenes obtenidas mediante la técnica de espectrofotometría de infrarrojo cercano (SW-NIR) está relacionado con el tiempo de almacenamiento de las muestras de pollo fileteadas y envasadas, siendo el intervalo de longitud de onda comprendido entre 791 nm y los 859 nm el que mejor discriminaría éste. Además esta relación vendría definida por la observada entre los valores de reflectancia ($\log(1/R)$) y los parámetros pH, N-BVT y $\log(\text{ufc/g})$.

En base a estos resultados se podría decir que el uso de imágenes multiespectrales de infrarrojo cercano (SW-NIR) puede ser un buen instrumento para la predicción de la frescura de carne de pollo fileteada y envasada, aunque son necesarios sucesivos estudios a fin de profundizar en la técnica y poder obtener una herramienta totalmente fiable y aplicable al sector.

AGRADECIMIENTOS

La realización del presente Trabajo de Tesis de Master ha sido financiado por la Conselleria d'Educació de la GVA, dentro del programa "ajudes per a la realització de projectes precompetitius d'I+D per a equips d'investigació" concedida al proyecto "Utilización de la técnica de análisis de imágenes multiespectrales SW-NIR (*short-wavelength near-infrared*) para el control de productos perecederos fileteados y loncheados envasados a vacío o en atmósferas modificadas".

REFERENCIAS

- Alimarket, 2007. La carne de ovino se adapta al libre servicio. Alimarket octubre 2007, 319 – 333.
- Alimarket, 2007. Martínez Lorient. Alimarket octubre 2007, 20 – 22.
- A.O.A.C., Association of Official Analytical Chemist (1997). Official Methods of Analysis, 16th Ed. Association of Official Analytical Chemist. Arlington, Virginia, USA.
- Bjarno, O. C. 1982. Multiple analyses of meat products by infrared spectrophotometer: Collaborative study. Journal of Association of Official Analytical Chemists, 65, 696.
- CEE (2005). Reglamento (CE) nº 2074/2005 de la comisión de 5 de diciembre de 2005 por el que se establecen medidas de aplicación para determinados productos (...). Sección II, Capítulo I: Valores límite de nitrógeno básico volátil total (NBVT) para determinadas categorías de productos de la pesca y métodos de análisis que deberán utilizarse. Diario Oficial de la Unión Europea, L338, 36.
- CEE (2007). Reglamento (CE) nº 1441/2007 de la comisión de 5 de diciembre de 2007 por el que se establecen los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. Diario Oficial de la Unión Europea, L322, 12.
- Chen, P.; McCarthy, M.J.; Kauten, R.; 1989. NMR for internal quality evaluation of fruits and vegetables. Transactions of the ASABE 32 (5), 1747–1753.
- Chun H.H., Kim J.Y., Lee B.D., Yu D.J. and Song K.B.. 2009. Effect of UV-C irradiation on the inactivation of inoculated pathogens and quality of chicken breasts during storage. doi:10.1016/j.foodcont.2009.06.006.
- Dah-Jye, L.; Robert, S.; James, A.; Steve M. 2008. Development of a machine vision system for automatic date grading using digital reflective near-infrared imaging. Journal of Food Engineering 86., 388–398
- De Fremery, D.; Lineweaver, H. 1962. Early post mortem chemical and tenderness changes in poultry. In: Leitch, J. M. (ed) Chemical and physical aspects of food. Gordon and Breach, New York, pp.13-21
- Di Wu, Yong He & Shuijuan Feng., 2008. Short-wave near-infrared spectroscopy analysis of major compounds in milk powder and wavelength assignment. Analytica Chimica Acta, V. 610, (2), 232-242.
- Economou T., Pournis N., Ntzimani A., Savvaidis I.N. 2009. Nisin–EDTA treatments and modified atmosphere packaging to increase fresh chicken meat shelf-life. Food Chemistry (114), 1470–1476.

- Ellis, D. I.; Broadhurst, D.; Kell, D. B.; Rowland, J. J.; Goodacre, R. 2002. Rapid and quantitative detection of the microbial spoilage of meat by Fourier transform infrared spectroscopy and machine learning. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, 2822–2828.
- Fuentes, A. 2008. Desarrollo de productos ahumados a partir de lubina (*Dicentrarchus labrax* L.) Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia.
- He, D. Wu.; S, J. Feng. 2007. Fast measurement of sugar content of yogurt using Vis/NIR-spectroscopy, *International Journal of Food Properties*, 10, (1), 1–7.
- Horváth, K, Zs. Seregély, É. Andrásy, I. Dalmadi, J. Farkas. 2008. A Preliminary Study Using Near Infrared Spectroscopy to Evaluate Freshness and Detect Spoilage in Sliced Pork Meat. *Acta Alimentaria*, Vol. 37, Nr.1, 93–102
- Huff-Lonergan Elisabeth, Lonergan Steven M. (2005). Mechanisms of water-holding capacity of meat: The role of postmortem biochemical and structural changes (Review). *Meat Science* 71, 194–204.
- Huidobro A. y M. Tejada. 1990. Determinación analítica de los compuestos nitrogenados no proteicos en el músculo de pescado. Aplicación al control de calidad. *Rev. Agroquímica. Tecnología de Alimentos*, 30(3):293-300.
- In-Seon Park, Yong-Jin Cho, Namsoo Kim., 2000 Characterization and meat freshness application of a serial three-enzyme reactor system measuring ATP-degradative compounds. *Analytica Chimica Acta*, 404, 75–81.
- Isaksson T, Charles E. Miller, Tormod Nyes. 1992. Nondestructive NIR and NIT Determination of Protein, Fat, and Water in Plastic-Wrapped, Homogenized Meat. *Applied Spectroscopy*. Vol 46, Nr 11, 1685- 1694
- ISO Norm 4833. 2003. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of microorganisms - Colony-count technique at 30 degrees C.
- Kaneki N., Miura T., Shimada K., Tanaka H., Ito S., Hotori K., Akasaka C., Ohkubo S., Asano Y., 2004. Measurement of pork freshness using potentiometric sensor. *Talanta*, 62, 217–221.
- Ko J. K.; Ma Y. H.; Song, K. B. 2005. Effect of chlorine dioxide treatment on microbial growth and qualities of chicken breast, *Journal of Food Science and Nutrition* 10 (2), 122–129.
- Laurent, W.; Bonny, J. M.; Renou, J. P. 2000. Muscle characterisation by NMR imaging and spectroscopic techniques. *Food Chemistry*, 69, 419–426.
- Lin, M.; Al-Holy, N.; Mousavy-Hesary, M.; Al-Qadiri, H.; Cavinato, A. G.; Rasco, B.A. 2004. Rapid and quantitative detection of the microbial spoilage of chicken breasts by diffused reflectance spectroscopy (600–1100 nm). *Lett. appl. Microbiol.*, 39, 148–155.
- Lin, M.; Mousavi, M.; Al-Holy, M.; Cavinato, A. G.; Rasco, B. A. 2006. Rapid near infrared spectroscopic method for the detection of spoilage in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillet. *Journal. Food Science*, 71(1), S18–S23.
- Malle, P.; Tao, S. H. 1987. Rapid Quantitative Determination of Trimethylamine using Steam Distillation. *Journal of Food Protection* 50, (9), 756-760
- McFarlane, N. J. B.; Speller, R. D.; Bull, C. R.; Tillett, R. D. 2003. Detection of bone fragments in chicken meat using X-ray backscatter. *Biosystems Engineering*, 85(2), 185–199.
- McGinnis J. P.; Fletcher D. L.; Papa C. M.; Buhr R. J. 1989. Early post mortem metabolism and muscle shortening in *Pectoralis major* muscle of broiler chickens. *Poultry science* 68, 386-392
- Meulemans, A.; Dotreppe. O.; Leroy, B.; Lecocq. H.; Istasse, L.; Clinquart, A. 2002. Prediction of technological and organoleptic properties of porcine meat by near infrared spectroscopy. In 48th ICoMST, Rome, Italy.
- Monziols, M.; Collewet, G.; Bonneau, M.; Mariette, F.; Davenel, A.; Kouba, M. 2006. Quantification of muscle, subcutaneous fat and intermuscular fat in pig carcasses and cuts by magnetic resonance imaging. *Meat Science*, 72, 146–154.
- Osborne, Brian G. 2000. Near-infrared Spectroscopy in Food Analysis. *Encyclopedia of Analytical Chemistry: Applications, Theory and Instrumentation Volume 12: Electronic Absorption and Luminescence, Gas Chromatography, Infrared Spectroscopy, Kinetic Determinations*. John Wiley & Sons Inc, New York.
- Pascual, A. M.; Calderón, P. V. 2000. Microbiología alimentaria: metodología analítica para alimentos y bebidas. Díaz de Santos S.A. Madrid.
- Richardson, R. I.; Mead, G.C. 2001. Ciencia de la Carne de Ave. Acribia, S. A. Zaragoza

- Ripoll, G.; Albertí, P.; Pane, B.; Olleta, J. L.; Sañudo, C. 2008. Near-infrared reflectance spectroscopy for predicting chemical, instrumental and sensory quality of beef. *Meat Science* 80, 697-702
- Ruiz-Cabrera, M. A.; Gou, P.; Foucat, L.; Renou, J. P.; Daudin, J. D. 2004. Water transfer analysis in pork meat supported by NMR imaging. *Meat Science*, 67, 169–178.
- Sasic, S : Ozaki, Y., 2001. Short-wave near-infrared spectroscopy of biological fluids. 1. Quantitative analysis of fat, protein, and lactose in raw milk by partial least-squares regression and band assignment. *Anal-Chem.* Jan 1; 73(1), 64-71.
- Smolander, M.; Alakomi, H.; Ritvanen, T.; Vainionpää, J.; Ahvenainen, R. 2004. Monitoring of the quality of modified atmosphere packaged broiler chicken cuts stored in different temperature conditions. A Time–temperature indicators as quality-indicating tools. *Food Control* (15), 217–229.
- Subedi, P.P.: Walsh, K.B.; Owens, G. 2007. Prediction of mango eating quality at harvest using short-wave near infrared spectrometry. *Postharvest Biology and Technology*, 43, 3, 326-334.
- Stewart, M. K.; Fletcher, D. L.; Hamm, D.; Thomson, J. E. 1984. The influence of hot boning broiler breast muscle in pH decline and toughening. *Poultry Science*, 63, 1935-1939.
- Zhang, W.G.; Lonergan, S. M.; Gardner, M. A.; Huff-Lonergan, E. 2005. Contribution of postmortem changes of integrin, desmin and μ -calpain to variation in water holding capacity of pork.
- Zhang, Zhe.; Jin, Tong.; Dong-hui, Chen.; Yu-bin, Lan. 2008. Electronic Nose with an Air Sensor Matrix for Detecting Beef Freshness. *Journal of Bionic Engineering*, 5, 67–73.