



UNIVERSIDAD DE GRANADA

DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA

***NUEVAS APLICACIONES INFORMÁTICAS PARA LA
CLASIFICACIÓN DE LA CARNE DE CERDO
IBÉRICO EMPLEANDO MORFOMETRÍA Y
REFLECTANCIA ESPECTRAL***

TESIS DOCTORAL

Fernando García del Moral Martín

Granada, 2007

“NUEVAS APLICACIONES INFORMÁTICAS PARA LA CLASIFICACIÓN DE LA CARNE DE CERDO IBÉRICO EMPLEANDO MORFOMETRÍA Y REFLECTANCIA ESPECTRAL”

Memoria que presenta el Ldo. Fernando García del Moral Martín para optar al grado de Doctor en Tecnología y Calidad de los Alimentos.

Directores de tesis:

Francisco O’Valle Ravassa

Profesor Titular de Anatomía Patológica
Facultad de Medicina
Universidad de Granada

Leopoldo Martínez Nieto

Catedrático de Ingeniería Química
Facultad de Ciencias
Universidad de Granada

A mi madre.
Todo lo que soy te lo debo a ti.

“No uno ni dos. ¡¡Tres como tú...!”

AGRADECIMIENTOS

En su día me advirtieron del peligro de escribir los agradecimientos antes que la tesis. Muchas veces a lo largo de la elaboración de este trabajo he pensado en toda esa gente a la que tenía que agradecer su colaboración, apoyo o consuelo. Ahora que llega el momento soy consciente de las muchas personas que han arrimado el hombro, más que por su trabajo, por su amistad y calidad humana.

A mi padre, maestro, tutor, jefe y lo que se tercié. Quien tiene la suerte de haberlo conocido sabe lo polifacético de su figura. De él he aprendido el rigor en el trabajo, el gusto por la gastronomía y la esencia de un buen proyecto: un material y métodos comestible y unos resultados lo más sabrosos posibles. Pero si algo me ha marcado por encima de todo lo que me has dado es la inmensa confianza que has tenido en mi capacidad que, aún dudando de su existencia, tengo claro que es mérito tuyo.

A Javier Campos, Director General de Bodegas Campos, que ha hecho aflorar en mí la motivación necesaria para hacer esta tesis doctoral contrarreloj. Tu apuesta personal me ha hecho ver una gran puerta de salida al final de este largo túnel. Espero estar a la altura, Jefe, porque menuda la que se me avecina.

A Domingo Coca, mi Maestro de escuela, quien hizo de la sonrisa de un niño nuevo en 4º de EGB toda una apuesta personal. Muy agradecido, porque hay personas que marcan una vida. Ánimo en tu importante labor en silencio. Espero que ésta tesis doctoral, y lo que venga, sea suficiente recompensa por mi parte.

A Paco O'Valle, esa incansable sonrisa en el despacho de al lado. Porque hay personas que pasan por tu vida y no sabes cómo encuadrarlas, y a ti no sé si llamarte jefe, amigo o tito. Gracias por todas esas sonrisas y buenos

consejos, que ha llovido ya mucho desde eso de “en los carteles han puesto un nombre que no lo puedo leer...”.

A mi tito Luís, hidalgo caballero, elocuente interlocutor y gran amante de la Literatura Española. Si algún día te transmutas en Don Quijote, búscame para que sea tu Sancho. Nunca te pedí perdón por aquella escapada camino de 7 Lagunas. Pero es que cuando uno es un alma libre, ¡¡cuánto molestan las ataduras!! Gracias por esas excursiones y por las enseñanzas de la vida misma que ilustras a través de la Literatura Española. Son *cojonúas*.

A Leopoldo Martínez, codirector de esta tesis doctoral y ante todo un ejemplo de lucha y entereza. Esa fortaleza no es fácil de encontrar y estoy seguro que nuevos caminos harán cruzarse a nuestras vidas, a ser posible de manos del aceite de oliva.

A Marta y Luci, que se tienen el cielo ganado. Hermanas menores, reinas de mi vida y sufridoras del Terror de la casa, debe ser bonito tener un hermano tan *quemasangres* como yo. Pero...y lo bien que nos lo pasamos.

A Rai. No por ser mi hermano mayor, ni por ser compañero de cuarto durante tantos años. Me he proyectado en ti mucho más de lo que tú te crees y has sido un modelo a seguir mucho más de lo que yo me pienso.

A Wisam, porque si una persona no encuentra un amigo como tú, vaya vida a medias, vaya “última ronda” sin tomar y vaya amaneceres sin conversación trascendental y alguna que otra copa de más. A ver...

A Marisa. Da vértigo mirar atrás en solo un año. Gracias.

Y como en todo trabajo científico y por estricto orden alfabético, a los malditos: Antonio L., Burell, Dieguito, Dorothy, FW, Lunera, Peli, Ronardo, Tomás Oner y demás almas *surconsientes* que me acompañan cada fin de

semana en escaladas, travesías y *rutting* diversos. Si el trabajo satura la mente, cada finde en vuestra compañía se me despeja.

A Maria Dolores Rodríguez y Paqui Sáez, por darme un trato mucho más familiar que “técnico” y por vuestro impecable trabajo de laboratorio.

A Garrido, por enseñarme el valor de ser operativo.

A Maite Sevilla, porque para ser casi la última en llegar, tu trabajo de Secretaría ha sido fundamental para quitarme ese poquito estrés de papeleo que tan mal sienta a última hora.

A todos, mil gracias y...¡¡¡qué equivocaos estáis...!!! ;-)

Resumen.

La carne de cerdo ibérico no destinada a chacinas y embutidos es uno de los productos gastronómicos de excelencia emergentes en Andalucía. Hasta ahora, para la evaluación de su calidad gastronómica, textural y de pureza respecto a la contaminación de la raza ibérica con razas híbridas se han empleado procedimientos basados en métodos tradicionales de cata y evaluación genética mediante técnicas de análisis molecular. El objetivo general del presente estudio ha sido desarrollar aplicaciones informáticas para la clasificación rápida, objetiva, automática y online de la carne de cerdo ibérico. Para cumplir este objetivo se ha trabajado en dos líneas independientes, diseñándose por un lado aplicaciones de visión artificial y morfometría para la cuantificación del tejido conectivo intramuscular, grasa intramuscular y tejido muscular sobre imágenes digitales de carnes procedentes de diferentes especies animales captadas con un sistema de video acoplado a un microscopio. En otra línea de desarrollo se han puesto a punto técnicas de reflectancia espectral en el rango del visible e infrarrojo cercano sobre el músculo *masseter* de cerdo ibérico y se han procesado los complejos datos obtenidos mediante redes neuronales artificiales.

Para el desarrollo de la primera parte, referente a la cuantificación histológica por visión artificial, se ha trabajado con animales de 6 especies diferentes: cerdo blanco de la raza híbrida Large White, cerdo ibérico, cordero, vaca de la raza Rubia Gallega, buey de Kobe y pichón. Se tomaron secciones histológicas que fueron teñidas con rojo Sirio y hematoxilina-eosina. La aplicación diseñada ha tenido como objetivo la cuantificación automática del tejido conectivo intramuscular y la retracción de las fibras musculares en imágenes tomadas a través de un sistema de visión artificial acoplado a un microscopio y consta de los siguiente módulos: captura automática, umbralización automática, algoritmos de filtrado morfológico, identificación del tejido conectivo intramuscular y análisis de imagen. Para

evitar las interferencias causadas por la iluminación y las aberraciones de la cámara durante la captura de imagen, las sombras detectadas por el sistema en la imagen digitalizada fueron corregidas por comparación de la imagen píxel por píxel con una imagen de fondo previamente capturada. La reproducibilidad intra- e interobservador ha sido validada en nuestro estudio por cuatro observadores expertos independientes, no encontrando diferencias significativas ($p < 0.05$) y consiguiéndose un acuerdo intraobservador $> 95\%$ e interobservador $> 90\%$.

Una vez adaptada la aplicación, se ha procedido al estudio de carnes de diferentes especies animales y músculos de diferentes partes de su anatomía. En las cuantificaciones llevadas a cabo se han observado diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje y área ocupada por tejido conectivo intramuscular ($p < 0.001$, Kruskal Wallis). El músculo *masseter* de la raza de vaca Rubia Gallega posee el mayor porcentaje de tejido conectivo intramuscular (28,75%, $p = 0.009$, Mann-Whitney U test), seguido del músculo *longissimus thoracis* en el cerdo ibérico (17,02%), el músculo *longissimus thoracis* de cordero (8,43%), *triceps brachii* de cordero (7,53%), *longissimus thoracis* de buey de Kobe (4,37%), *pectoralis major* de pichón (4,11%), *longissimus thoracis* de cerdo blanco y por último el músculo *longissimus thoracis* de carne de vaca Rubia Gallega (3,20%).

El tamaño del perimio ha sido significativamente diferente en los distintos músculos estudiados ($p < 0.001$, Kruskal Wallis). El área ocupada por el perimio ha sido significativamente mayor ($p < 0.05$, test U de Mann-Whitney) en el músculo *masseter* de la raza Rubia Gallega de vaca (75,07%) comparado con *longissimus thoracis* de cerdo blanco (22,59%), *longissimus thoracis* de cordero (20,65%), *triceps brachii* de cordero (13,78%), *longissimus thoracis* de cerdo ibérico (9,93%), *pectoralis major* de pichón (7,66%), *longissimus thoracis* de de buey de Kobe (5,82%) y el valor menor se presenta en el músculo *longissimus thoracis* de vaca Rubia Gallega (3,00%).

Diferencias significativas han sido encontradas entre las diferentes especies estudiadas para la retracción de la fibra muscular ($p < 0.001$, Kruskal-Wallis). El mayor grado de retracción se ha observado en el músculo *longissimus thoracis* del buey de Kobe (22,69%), seguido de *longissimus thoracis* de cerdo ibérico (20,16%), *longissimus thoracis* de vaca Rubia Gallega (17,12%), *longissimus thoracis* de cerdo blanco (13,45%), *triceps brachii* de cordero (13,27%), *masseter* de vaca Rubia Gallega (11,86%), *pectoralis major* de pichón (11,52%), y la menor en *longissimus thoracis* de carne de cordero (3,16%).

Como complemento a la tecnología de visión artificial para la cuantificación en cortes histológicos que se ha comentado, en una segunda parte del estudio se han desarrollado técnicas no invasivas y con un alto potencial de análisis, como es la reflectancia espectral en el rango visible e infrarrojo cercano del espectro. Se ha trabajado con 30 animales de porcino, 15 de la raza híbrida blanca y otros 15 de raza ibérica. En todos ellos se ha llevado a cabo la cuantificación de reflectancia espectral sobre el músculo *masseter*. En una primera aproximación a los datos de reflectancia espectral se analizaron 4 espectros diferentes, procedentes de los lados magro y veteado del músculo *masseter* de los dos lados de la canal. El algoritmo aplicado para calcular la información mutua de las longitudes de onda de los espectros de cerdos blancos e ibéricos ha generado un ranking diferenciando las longitudes de onda más relevantes. Los clasificadores han sido obtenidos por entrenamiento de los respectivos modelos aplicando la variable con mayor información mutua con respecto a la salida. Se han aplicado redes neuronales de funciones de base radial generadas con el algoritmo de clústering difuso-probabilístico para aproximación funcional y el algoritmo de las C-medias difuso, así como máquinas de vectores de soporte, obteniéndose los mejores resultados en el primer caso. Los tres

modelos de red neuronal ensayados clasifican correctamente las muestras en todos los casos por encima del 97%.

Una vez seleccionado el algoritmo de clústering difuso-probabilístico para aproximación funcional se ha llevado a cabo una clasificación del músculo *masseter* del lado derecho de los animales, tanto cerdos ibéricos como blancos, mediante dos modelos: algoritmos de análisis de la información mutua y caracterización del espectro según la bibliografía científica. En las medidas de reflectancia espectral hemos observado una clara dominancia de los pigmentos de la carne fresca. Se enfrentaron los datos derivados de la información mutua frente a los derivados de la caracterización del espectro para la clasificación de la raza de cerdo ibérico por el algoritmo de clústering difuso-probabilístico para aproximación funcional. En ambos supuestos se han realizado los test utilizando diferentes tamaños para los conjuntos de casos entrenamiento/test del algoritmo (29/1, 28/2, 27/3, 25/5, 26/4 y 20/10). Se han aplicado redes neuronales artificiales bajo tres supuestos diferentes en función de las variables de entrada: 1, 3 y 10 longitudes de onda. Para el modelo con 1 longitud de onda se han conseguido porcentajes de acierto entre el 70 y el 90% para el modelo de información mutua y por encima del 90% para la caracterización del espectro. Con 3 variables de entrada porcentajes de acierto han sido mayores del 93% para ambos modelos, mientras que con 10 variables se han obtenido porcentajes con un mínimo de acierto de 73,33%. En conclusión, la unión de tecnologías de diferentes campos científicos y técnicos presentada en este estudio es una herramienta útil y de aplicación inmediata para la clasificación de la carne de cerdo ibérico y el aseguramiento de la calidad de sus productos.

Summary

Iberian pork not destined for cold meat production is one of the emerging gastronomic products of excellence in Andalusia. To date, the gastronomic and textural quality of this pork and its purity with respect to contamination by hybrid breeds have been evaluated by procedures based on traditional tasting methods and genetic analysis. The general objective of the present study was to develop computer applications for the rapid and objective online analysis of Iberian pork. This objective was met by following two independent lines of work. In one line, computer vision and morphometry applications were designed to quantify intramuscular connective tissue, intramuscular fat and muscle tissue on digital images of meat from different animal species acquired by using a video system coupled with a microscope. In the other line, spectral reflectance techniques in the visible and near-infrared range were adapted for the *M. masseter* muscle of Iberian pig, processing the complex data obtained by means of artificial neural networks.

For development of the first line of work, i.e., histological quantification by computer vision, animals from six different species were used: white pig of the Large White hybrid breed, Iberian pig, lamb, Rubia Gallega cattle, Kobe ox, and pigeon. Histological sections were stained with Sirius red and hematoxylin-eosin. The objective of this application was the automatic quantification of intramuscular connective tissue and muscle fiber retraction on images acquired using a computer vision system coupled with microscope and comprising the following modules: automatic acquisition, automatic thresholding, morphological filtering algorithms, identification of intramuscular connective tissue, and image analysis. In order to avoid interference caused by the lighting and by camera aberrations during image capture, shadows detected by the system on the digitalized image were corrected by comparing the image pixel-by-pixel with a previously acquired background image. Intra- and inter-operator reproducibility was validated by

four independent expert observers, finding no significant differences ($p < 0.05$) and achieving intra-observer agreement of $>95\%$ and inter-observer agreement of $>90\%$.

Once the application was adapted, studies were conducted on meat from different animal species and on muscles from different parts of their anatomy. Measurements obtained showed statistically significant differences in the percentage and area occupied by intramuscular connective tissue ($p < 0.001$, Kruskal Wallis). The highest percentage of intramuscular connective tissue was found in *M. masseter* of Rubia Gallega beef (28.75%, $p = 0.009$, Mann-Whitney U test), followed by *longissimus thoracis* of Iberian pork (17.02%), *longissimus thoracis* muscle of lamb (8.43%), *triceps brachii* of lamb (7.53%), *longissimus thoracis* of Kobe ox (4.37%), *pectoralis major* of pigeon (4.11%) and, finally, *longissimus thoracis* of Rubia Gallega beef (3.20%).

The size of the perimysium significantly differed among the studied muscles ($p < 0.001$, Kruskal Wallis). The area occupied by the perimysium was significantly larger ($p < 0.05$, Mann-Whitney U test) in the *M. masseter* of Rubia Gallega beef (75.07%) than in the *longissimus thoracis* of white pig (22.59%), *longissimus thoracis* of lamb (20.65%), *triceps brachii* of lamb (13.78%), *longissimus thoracis* of Iberian pig (9.93%), *pectoralis major* of pigeon (7.66%), *longissimus thoracis* of Kobe ox (5.82%), or *longissimus thoracis* muscle of Rubia Gallega beef (3.00%).

Significant differences in muscle fiber retraction were observed among the studied species ($p < 0.001$, Kruskal-Wallis). The highest degree of retraction was found in the *longissimus thoracis* muscle of Kobe beef (22.69%), followed by *longissimus thoracis* of Iberian pork (20.16%), *longissimus thoracis* of Rubia Gallega beef (17.12%), *longissimus thoracis* of white pig (13.45%), *triceps brachii* of lamb (13.27%), *M. masseter* of Rubia Gallega beef (11.86%), *Pectoralis major* of pigeon (11.52%), and *longissimus thoracis* of lamb (3.16%).

As a complement to the use of computer vision technology to quantify histological sections, a non-invasive technique with high potential for analysis was developed, i.e., spectral reflectance in the visible and infra-red range of the spectrum. Thirty pigs were used in this second line of work: 15 of white hybrid breed and 15 of Iberian breed. The spectral reflectance on *M. masseter* was quantified in all animals. In a first approach to the spectral reflectance data, four different spectra were analyzed from the *M. masseter* of all animals on the lean and marbled side on both sides of the carcass. The algorithm applied to calculate the mutual information on the wavelengths of the spectra of white and Iberian pork generated a differentiated ranking of the most important wavelengths. The classifiers were obtained by training of the respective models, applying the output variable with greatest mutual information. Radial Basis Function Neural Networks were generated with fuzzy-probabilistic clustering algorithm for functional approximation, and fuzzy C-means algorithm, as well as support vector machines, obtaining the best results with the first model. All three neural network models showed a correct classification of > 97% of samples.

Once the fuzzy-probabilistic algorithm for functional approximation was selected, *M. masseter* on the right side of the animals (white and Iberian) was classified by means of two models: mutual information analysis; and spectrum classification according to the scientific literature. Spectral reflectance measurements showed a predominance of fresh meat pigments. Data derived from mutual information were compared with those derived from spectrum characterization for classification of the Iberian breed by means of fuzzy-probabilistic clustering algorithm for functional approximation. For both models, tests were performed using different training/test set sizes (29/1, 28/2, 27/3, 25/5, 26/4 and 20/10). Artificial neural networks were applied according to three different assumptions as a function of input variables: 1, 3, and 10 wavelengths. When 1 wavelength was

considered, percentages of correct classification were 70-90% for the mutual information model and >90% for spectrum characterization; with 3 input variables, correct classification of >93% was achieved in both models; and with 10 input variables, correct classification of >73% was obtained in both models. In conclusion, the combination of technologies from different scientific and technical fields presented in this study represents a useful tool that can be immediately applied to classify Iberian pork and guarantee the quality of its products.

PRÓLOGO

Esta tesis se enmarca dentro del proyecto **“Mejora de la calidad gastronómica de la carne de cerdo ibérico: estudio textural, fisicoquímico, histológico y culinario”**, aprobado por la Corporación Tecnológica de Andalucía con nº de proyecto 06037 y la Fundación Empresa-Universidad de Granada con nº de proyecto 2772-00, desarrollado por la Sociedad Cooperativa Ganadera del Valle de los Pedroches (COVAP), Bodegas Campos y la Universidad de Granada, y con los siguientes objetivos generales:

1. Dotar, tanto a COVAP como a Bodegas Campos, de parámetros sólidos, probados científicamente, para mejorar sus sistemas de trazabilidad (control, seguridad y calidad) a lo largo de toda la cadena productiva del cerdo ibérico dentro de la filosofía de la granja a la mesa.
2. Mejorar las técnicas actuales de sacrificio de los animales, así como de la transformación de las canales, potenciando no solo el consumo del cerdo ibérico como producto curado, sino igualmente como producto fresco.
3. Mejorar las técnicas actuales de cocinado de la carne de cerdo ibérico y conocer los cambios físicos y químicos derivados del tratamiento térmico de la misma.
4. Estudiar nuevas técnicas de conservación de la carne (ultracongelación) para maximizar la calidad del producto sin alterar sus propiedades organolépticas.
5. Dar a conocer los resultados del proyecto para la mejora del sector.

Son objetivos específicos de este mismo proyecto y objeto de estudio en esta tesis doctoral:

- Desarrollar parámetros microscópicos para el control de calidad en muestras cárnicas de ganado porcino, tanto en raza blanca como ibérica, aplicando métodos de morfometría para obtener porcentajes de tejido magro, graso y conectivo sobre secciones microscópicas de tejido muscular teñido con rojo Sirio observadas con iluminación normal.

- Poner a punto técnicas de reflectancia espectral para la clasificación entre cerdo blanco e ibérico, así como entre mezclas genéticas de diferente pureza dentro de la raza ibérica.
- Estudiar la evolución de los tejidos conectivo, graso y magro en operaciones de tratamiento térmico frente al binomio tiempo/temperatura, evaluando la transformación del colágeno en gelatina debida al calor.

ÍNDICE GENERAL

Resumen	1
Summary	6
PRÓLOGO	11
ÍNDICE GENERAL	14
ÍNDICE DE FIGURAS	19
ÍNDICE DE TABLAS	23
PUBLICACIONES DERIVADAS DE ESTA TESIS DOCTORAL	25
1. INTRODUCCIÓN	27
1.1. INTRODUCCIÓN.....	28
1.1.1. Historia del cerdo ibérico.....	29
1.1.2. La raza porcina ibérica.....	30
1.1.3. Hábitat: la importancia de la dehesa.....	32
1.1.4. Influencia de la dieta: principales ácidos grasos.....	34
1.2. EL MÚSCULO ESQUELÉTICO.....	36
1.2.1. Composición del músculo esquelético.....	37
1.2.2. Tipos de músculos.....	37
1.2.3. Tipos de fibras musculares.....	39
1.2.4. Fibras musculares esqueléticas y proteínas miofibrilares.....	40
1.2.5. Proteínas sarcoplasmáticas.....	42
1.2.6. Tejido conectivo intramuscular.....	42
1.2.6.1. La fibra de colágeno.....	47
1.2.6.2. Enlaces cruzados del colágeno.....	48
1.2.7. Grasa intramuscular.....	51
1.2.8. El veteado de la carne de cerdo ibérico.....	53
1.3. TRANSFORMACIÓN DEL MÚSCULO EN CARNE.....	54
1.3.1. Bioquímica de la contracción muscular.....	54
1.3.2. Rigor mortis: instauración y resolución.....	55
1.3.3. Maduración de la carne.....	57
1.4. PARÁMETROS DE CALIDAD DE LA CARNE.....	61
1.4.1. pH.....	61
1.4.2. Color.....	62
1.4.2.1. Mioglobina.....	62

1.4.3. Capacidad de retención de agua.	65
1.4.4. Análisis de las propiedades texturales: Test de Warner-Bratzler. ...	67
1.5. EFECTOS DEL CALOR SOBRE LA CARNE.	68
1.5.1. La desnaturalización proteica.....	68
1.5.1.1. La desnaturalización proteica por el calor.	69
1.5.2. La transformación de colágeno en gelatina.....	71
1.5.3. La reacción de Maillard.	73
1.5.4. Pérdidas de agua por cocinado.....	73
1.5.5. Cambios del color de la carne provocados por el calor.....	74
1.6. CONGELACIÓN DE LA CARNE.	75
1.7. VISIÓN ARTIFICIAL.	77
1.7.1. De la histología a la histometría.	77
1.7.2. Tinciones de tejidos celulares para la observación óptica.....	77
1.7.3. Definición y percepción de imagen.....	78
1.7.4. Técnicas clásicas de microscopía digital.....	80
1.7.5. Componentes básicos del análisis de imagen.	80
1.7.5.1. El microscopio óptico.....	80
1.7.5.2. Sistemas informáticos para digitalización de imágenes.....	82
1.7.5.3. Proceso de calibración de medidas.	83
1.7.6. Bases de la visión artificial.	83
1.7.7. Aplicación de la visión artificial al estudio de la carne.	85
1.8. NUEVAS TÉCNICAS NO INVASIVAS PARA EL ANÁLISIS DE LA CARNE: REFLECTANCIA ESPECTRAL.....	86
1.9. REDES NEURONALES ARTIFICIALES.....	87
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	102
3. MATERIAL Y MÉTODOS	107
4. RESULTADOS.....	112
4.1. CAPÍTULO I.....	115
4.1.1. ABSTRACT.....	116
4.1.2. INTRODUCTION.....	117
4.1.3. MATERIAL AND METHODS.....	118
4.1.3.1. Animals.....	118
4.1.3.2. Histologic study.....	118
4.1.3.3. Image analysis morphometric study	119

4.1.3.3.1 <i>Image Capture</i>	119
4.1.3.3.2. <i>Image Processing</i>	119
4.1.3.4. Statistical analysis.....	119
4.1.4. RESULTS AND DISCUSSION.....	120
4.1.4.1. Programme.....	120
4.1.4.1.1 Automatic capture.	120
4.1.4.1.2. Automatic Thresholding.....	120
4.1.4.1.3. Morphologic Filtering Algorithm.....	121
4.1.4.1.4. IMCT Area Identification.....	121
4.1.4.1.5. Fibre retraction.....	121
4.1.4.1.6. Image Analysis.....	122
4.1.4.1.7. Algorithm Training.	122
4.1.4.1.8. Software validation.....	122
4.1.4.2. Application.	123
4.1.5. CONCLUSION	127
4.1.6. ACKNOWLEDGMENTS.....	128
4.1.7. REFERENCES.....	129
4.2. CAPÍTULO II.....	142
4.2.1. ABSTRACT	143
4.2.2. INTRODUCTION.....	143
4.2.3. DATA ANALYSIS AND CLASSIFICATION TECHNIQUES.....	145
4.2.3.1. Mutual Information.....	145
4.2.3.2. Radial Basis Function Neural Networks.....	147
4.2.3.2.1. Description.	147
4.2.3.2.2. Design Methodology.	148
4.2.3.3. Support Vector Machines.	148
4.2.5. EXPERIMENTAL RESULTS AND DISCUSSION.	150
4.2.6. CONCLUSIONS.....	152
4.2.7. ACKNOWLEDGEMENTS.	152
4.2.8. REFERENCES.....	153
4.3. CAPÍTULO III.....	161
4.3.1. ABSTRACT	162
4.3.2. INTRODUCTION.....	163
4.3.3. MATERIAL AND METHODS.....	164

4.3.3.1. Experimental design.	164
4.3.3.2. Macroscopic description of <i>M. masseter</i>	165
4.3.3.3. VIS/NIRS measurements.	165
4.3.3.3.1. Spectrometer.	165
4.3.3.3.2. Spectra.	165
4.3.4. Data analysis.	166
4.3.4.1. Mutual Information Ranking.	166
4.3.4.2. Radial Basis Function Neural Networks (RBFNN).	168
4.3.5. RESULTS AND DISCUSSION.	170
4.3.5.1. Results of macroscopic observations	170
4.3.5.2. Mutual Information Ranking.	170
4.3.5.3. VIS/NIR spectral characterization (VIS/NIR SC).	171
4.3.5.4. Breed classification by Neural Network: Mutual Information Ranking vs. VIS/NIRS Spectra Characterization.	173
4.3.6. CONCLUSIONS.	176
4.3.7. ACKNOWLEDGEMENTS.	176
4.3.8. REFERENCES.	177
5. DISCUSIÓN GENERAL	189
6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	213
6.1. CONCLUSIONES.	214
6.2. PERSPECTIVAS.	216
7. ANEXOS	218
7.1. “Permeability and mass transfer as a function of the cooking temperature during the frying of beefburgers” by Orosvári, B.K., Rocha, C.S., Sjöholm, I., & Tornberg, E. [Journal of Food Engineering, 75 (2006), 1-12].	219
7.2. Image analysis application for automatic quantification of intramuscular connective tissue in meat.	224
7.3. White and Iberian pork neural network classification by visible and near- infrared reflectance spectroscopy.	234

ÍNDICE DE FIGURAS

INTRODUCCIÓN

Figura 1. Variedades del cerdo ibérico. Tomado de Diéguez (1999).	32
Figura 2. Imagen de la Dehesa. Tomada de http://www.juntaex.es	33
Figura 3. Resumen de diferentes características analizadas en carne de cerdo ibérico. Tomado de Fernández et al. (2003).	35
Figura 4. Corte histológico transversal de fibras musculares típicas teñidas con hematoxilina-eosina y observadas al microscopio con objetivo de 20 aumentos.	36
Figura 5. Chuletón de vacuno mayor.	38
Figura 6. Sarcómero de músculo estriado mostrando el solapamiento entre los filamentos de actina y miosina. Tomado de Craig & Woodhead (2006).	41
Figura 7. Micrografía electrónica de barrido de la red endomisial en el músculo <i>sternomandibularis</i> de carne de vacuno después de la extracción del componente miofibrilar por NaOH. Tomada de Purslow (2005).	44
Figura 8. Tejido conectivo intramuscular de músculo <i>masseter</i> en ganado vacuno, observado con tinción de rojo Sirio y con objetivo de 4 aumentos.	45
Figura 9. Tipos de fibras de colágeno. Tomada de Bailey et al. (1998).	47
Figura 10. a) Localización de los enlaces maduros divalentes alineados en fibras de colágeno inmaduras. b) Localización de los enlaces maduros trivalentes derivados de enlaces divalentes inmaduros, en donde existe conexión con las miofibrillas. Tomada de Bailey (1998).	49
Figura 11. Resumen de la localización de los enlaces cruzados en diferentes estados de madurez del animal: inmaduros (I), maduros (I) y senescentes por glicación (↑). Tomada de Bailey et al. (1998).	50
Figura 12. Corte histológico de carne de cerdo ibérico. Se puede observar una gran veta de grasa intramuscular sostenida por el tejido conectivo intramuscular. Tinción rojo Sirio observada con el objetivo de 4 aumentos.	52
Figura 13. Adipocitos de grasa intramuscular en estrecha relación con el tejido conectivo intramuscular, constituyendo lo que se conoce como veteado. Corte histológico del músculo <i>masseter</i> de carne de cerdo ibérico teñida con rojo Sirio y observado con objetivo de 20 aumentos.	53

Figura 14. Fuerza del perimio aislada de carne tras cocinarla a las temperaturas indicadas. Comparación de perimio muscular con un día de evolución post mortem (no madurado) y músculo almacenado durante 14 días (madurado). Tomada de Purslow (2005).....	59
Figura 15. Visión esquemática de los cambios potenciales en diámetro de las células musculares durante el envejecimiento post mortem influenciado por la proteólisis. Tomada de Huff-Lonergan & Lonergan (2005).	60
Figura 16. Interconversiones redox de la mioglobina en la superficie de la carne. Tomado de Mancini & Hunt (2005).....	64
Figura 17. Sistema de análisis de textura.	67
Figura 18. De arriba a abajo y de izquierda a derecha: fibras musculares de carne de cerdo ibérico cruda (40x), contracción de las miofibrillas por efecto del calor en carne de cerdo ibérico cocinada (40x), turgencia de las fibras musculares en carne de vacuno madurada (20x), retracción de las fibras musculares en carne de vacuno cocinada (20x). Tinción de hematoxilina-eosina.....	70
Figura 19. Corte histológico del músculo <i>masseter</i> de cerdo ibérico cocinado durante 2 horas y 45 minutos a 94°C. Se puede observar la completa gelatinización del colágeno endomisial. Tinción rojo Sirio observada con objetivo de 20 aumentos.	71
Figura 20. Corte histológico del músculo <i>masseter</i> de cerdo ibérico cocinado durante 2 horas y 45 minutos a 94°C. Perimio en fase de gelatinización del colágeno. Tinción rojo Sirio observada con objetivo de 20 aumentos.....	72
Figura 21. Niveles en el proceso de visión artificial. Tomado de Brosnan & Sun (2004).....	84

RESULTADOS

CAPÍTULO I.

Figure 1. Flow chart of image analysis application for automatic quantification of IMCT, showing main components of the image analysis application developed to automatically quantify intramuscular connective tissue in meat sections. The programme is implemented in three parts: (A) capture and pre-processing of digital image, (B) processing of pre-processed image, and (C)

analysis of processed image and measurement of parameters. Black-white microscopic images of M of Rubia Gallega beef (Sirius red, x10). 134

Figure 2. Flow chart of the algorithm used to determine geodesic length, iteratively combining logical and mathematical morphology operations on the binary image..... 135

Figure 3. Flow chart of the algorithm implemented for the geodesic length (see text). 136

Figure 4. Flow chart of the hole-filling module. Hole-filling was obtained iteratively by using the negative of the negative image of the objects without holes according to the sequence “*Dilation*” and “*And*” applied to the image frame and negative of the initial image with holes. 137

Figure 5. Phases of image analysis process. A: Digital image for quantification of IMCT of the meat (Sirius red 10x); B: Digital image for quantification of *perimysium* (Sirius red 20x); C: Digital image for quantification of muscle fibre retraction (hematoxylin-eosin 20x). D, E, F: Images normalized and improved using the computer application. G, H, I: Binary images; the area of interest is in black. J, K, L: Images resulting from the application of the filtering and reconstruction algorithms corresponding to elements extracted from connective tissue areas in the thresholded image and added to images G, H, and I, respectively. M: Area of IMCT; N: Area of *perimysium*; O: Area of muscle fibre retraction to be quantified. 138

CAPÍTULO II

Figure 1. A Radial Basis Function Neural Network..... 156

Figure 2. Ranking of variables for the set of samples by Mutual Information. Variables 1-2151: lean side of the right *masseter*; variables 2152-4302: marbled side of the right *masseter*; variables 4303-6453: lean side of the left *masseter*; variables 6454-8604: marbled side of the left *masseter*. 157

CAPÍTULO III

Figure 1. A Radial Basis Function Neural Network..... 184

Figure 2. Mutual Information of the 4302 study variables. Variables 1-2151: lean side; variables 2152-4302: marbled side. 185

Figure 3. Mean of reflectance values in the VIS/NIR range of the spectrum. 1: White pork, lean side. 2: Iberian pork, lean side. 3: White pork, marbled side 4: Iberian pork, marbled side..... 186

Figure 4. Mean of absorbance values in the VIS/NIR range of the spectrum. 1: White pork, lean side. 2: Iberian pork, lean side. 3: White pork, marbled side 4: Iberian pork, marbled side..... 187

ÍNDICE DE TABLAS

RESULTADOS

CAPÍTULO I

Table 1. Morphometric parameters in the different meat tissues studied using the digital image analysis application. 133

CAPÍTULO II

Table 1. Misclassifications and percentage of successful classifications for the different algorithms using different numbers of variables 158

CAPÍTULO III

Table 1. The most important wavelengths obtained by Mutual Information or VIS/NIRS Spectra Characterization for the classification of white and Iberian pork, with their respective Mutual Information Rankings and amount of Mutual Information and the corresponding side of *M. masseter*..... 181

Table 2. Neural Network Classification of white and Iberian pork using Mutual Information (set A) or VIS/NIRS Spectra Characterization (set B), entering different numbers of input variables as a function of the most important wavelengths. 182

PUBLICACIONES DERIVADAS DE ESTA TESIS DOCTORAL

del Moral, F.G., O'Valle, F., & del Moral, R.G. (2007). Letter to the Editor: "Permeability and mass transfer as a function of the cooking temperature during the frying of beefburgers" by Oroszvári B.K., Rocha C.S., Sjöholm I. & Tornberg E. [Journal of Food Engineering 74 (2006) 1-12]. Publicado en **Journal of Food Engineering**, 80, 374-376.

del Moral, F.G., O'Valle, F., Masseroli, M., & del Moral, R.G. (2007). Image analysis application for automatic quantification of intramuscular connective tissue in meat. Publicado en **Journal of Food Engineering**, 81, 33-41.

Guillén, A., **del Moral, F.G.**, Herrera, L.J., Rubio, G., Pomares, H., & Rojas, I. (2007). Using Near Infrared Spectroscopy in the Classification of White and Iberian Pork with Neural Networks. **IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics**. Enviado para publicación.

del Moral, F.G., Guillén, A., del Moral, L.G., O'Valle, F., Martínez, L., & del Moral, R.G. Duroc and Iberian Pork Neural Network Classification by Visible and Near Infrared Reflectance Spectroscopy. **Journal of Food Engineering**. Enviado para publicación.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. INTRODUCCIÓN.

La raza de cerdo ibérico (*Sus mediterraneus*) es una raza nativa del suroeste de la Península Ibérica que presenta un alto potencial adipogénico (Daza et al., 2007). Esta capacidad para acumular grasa en su tejido muscular hace que los productos ibéricos, y en especial a los productos curados, sean de una alta calidad, siendo por tanto su precio mayor en el mercado (Niñoles et al., 2007).

Estos animales se crían de forma natural en la Dehesa, un ecosistema natural constituido fundamentalmente por alcornoques, encinas y quejigos, y disfrutan de una fase final de ceba basada en el consumo de recursos naturales, principalmente hierba y bellotas en condiciones extensivas, periodo conocido como *montanera* (Gaspar et al., 2007; Niñotes et al., 2007). Frente a este sistema tradicional de alimentación del cerdo ibérico ha surgido, a raíz del alto precio alcanzado por los productos ibéricos en el mercado, una alimentación en intensivo conocida como *cebo*, en donde el animal está en cautiverio y se alimenta de pienso concentrado, generándose productos de menor calidad (Niñotes et al., 2007).

En el pasado esta raza se caracterizó por un bajo rendimiento económico, aunque en la actualidad y debido a la alta demanda de productos ibéricos curados el censo de cerdo ibérico ha incrementado notablemente, alcanzando el millón de animales (MAPA, 2004). Tradicionalmente, la raza ibérica ha sido cruzada con credos de la raza Duroc para mejorar determinados parámetros productivos, como puede ser el mayor número de lechones por camada y un mayor peso en el destete y al final de la fase de ceba (Ramírez & Cava, 2007). Los cruzamientos con la raza Duroc han generado una mezcla con raza ibérica con mayor porcentaje de carne magra, menos grasa y una tasas de crecimiento mayores, porque desde 2001 la legislación española (BOE, 15 de Octubre de 2001) solo permite cruces entre ibérico y Duroc cuando la línea materna es pura ibérica para preservar la pureza de la raza ibérica.

Estos parámetros están influenciados por las características de la carne cruda, la cual se ve significativamente afectada por los genotipos híbridos ibérico-Duroc. Ramírez et al. (2007) afirman que el cruce con genotipos Duroc seleccionados para producción de carne con cerdos ibéricos reduce significativamente la calidad de los productos ibéricos, provocando un menor veteado y contenidos menores de grasa intramuscular, menos intensidad de

color y olor, características texturales pobres, mayor porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados, mayor susceptibilidad a la ranciedad y mayor tendencia a gusto a salado, concluyendo que la caracterización de los cruces de ibérico con líneas de Duroc es necesaria para evitar pérdidas en la calidad de los productos ibéricos (Ramírez et al., 2007).

1.1.1. Historia del cerdo ibérico.

La relación entre el hombre y el cerdo es ancestral. Se piensa que el origen del cerdo ibérico actual fue hace unos 12.000 de años, entre la formación de Yugoslavia y el Lejano Oriente. Esto es debido a que el número de cromosomas de los jabalíes salvajes en este área, treinta y ocho, coinciden con los de los cerdos actuales (Aparicio Tovar et al., 2006).

Los primeros cerdos domésticos se sitúan en China, aproximadamente 5.000 años antes de Cristo. La mayoría de los autores están de acuerdo en que éstos descenden de los jabalíes locales, como especie omnívora que aprovechaba los desechos de las colonias humanas, acercándose cada vez más a su hábitat y adaptándose ineludiblemente a él. Debido a esta proximidad, el hombre encontró un medio cercano de alimentación que no planteaba excesivos problemas para su explotación, ya que se reproducían con facilidad y se alimentaban con cualquier tipo de recursos, aunque su explotación y desarrollo fue lento en comparación con otras especies domesticadas debido a la competencia con el hombre en cuanto a materias primas para la alimentación, omnívoras ambas especies (Rosselló et al., 2003; Aparicio Tovar et al., 2006).

Ya de la civilización griega trascienden leyendas en las que el cerdo aparece como un animal domesticado, pero es en el Imperio Romano cuando el cerdo alcanza su esplendor, constituyendo uno de los pilares de la alimentación, tanto en productos frescos como curados con la ayuda de la sal, condimento fundamental e irremplazable, objeto de comercio universal y obligatorio. Mientras que en la culturas semitas el cerdo era considerado un animal impuro, en la Europa cristiana se consumió habitualmente la carne de cerdo, encontrándose una relación directa entre el hombre y el cerdo y su imagen está presente en España en numerosas escenas que perduran en templos religiosos de numerosas ciudades, en donde los cerdos aparecen perfectamente identificados e integrados dentro de la escenas costumbristas de

la época. Igualmente, en la literatura de la época son múltiples las referencias a dicho animal (Rosselló et al., 2003).

Es de destacar también la importancia que tuvieron el cerdo ibérico y sus derivados en los viajes transatlánticos que se produjeron a partir de finales del siglo XV, con el descubrimiento del Nuevo Mundo. Está fehacientemente constatado que las piezas curadas del cerdo ibérico servían de provisión a los marineros durante las largas travesías hacia América. Posteriormente, durante el siglo XVI aparecen las leyes estrictas que fomentan el aumento de la cabaña ganadera nacional, mostrando gran interés en el cerdo ibérico y el aprovechamiento de la bellota, llegándose a castigar el robo de estos frutos.

1.1.2. La raza porcina ibérica.

Según su origen, hay dos grandes grupos de cerdos domésticos, de los que derivan todas las razas explotadas hoy día: el *Sus scrofa ferus* o jabalí de la Europa Noroeste y Alpina, y el *Sus striatusus* o jabalí indochino. Del primero se derivará directamente la agrupación de cerdos celtas, como los originarios Large White de origen inglés.

Directamente del *Sus striatusus* derivará el *Sus vitatus* como elemento evolutivo; a su vez de él derivarán como descendientes en línea directa las razas asiáticas, que se caracterizan por aumentar de forma muy apreciable el número de lechones por camada, llegando en algunos a tener 15 lechones por camada como media de la raza Jia Xing.

El cruce dirigido entre los representantes de los dos grupos anteriormente referidos dará lugar a la agrupación de las razas precoces europeas tan extendidas hoy en día por todo el mercado europeo y norteamericano. Las características de estos animales se deben a la aportación de los dos orígenes distintos. Por una parte, los cerdos celtas aportaban una mayor conformación de la canal, un mayor rendimiento y unos índices de transformación más beneficiosos de que las razas asiáticas, que por otra parte ofrecían al cruce su alto índice de prolificidad y su acentuado instinto maternal derivado principalmente de una gran capacidad lechera.

Estos animales derivados del *Sus mediterraneus* se ubican en la zona de la cuenca mediterránea, Italia y Grecia principalmente. De aquí pasarían al continente africano y de éste, de forma inevitable, llegan a las regiones

levantinas y andaluzas, en la Península Ibérica. Estos cerdos comienzan a establecerse y a adaptarse fundamentalmente en las extensiones de dehesas de la Meseta y Extremadura. Queda así conformado el mapa porcino español con dos zonas bien diferenciadas que gráficamente se separan por una línea divisoria imaginaria traza desde Zamora a Almería, asentándose los derivados del originario cerdo celta en el Norte y los ibéricos en el Sur.

Si se observan las zonas de asentamiento del cerdo ibérico se comprobará que tienen unas características diferenciales muy apreciables, tan distintas como la comarcas de la Sierra y el Andévalo en Huelva o la Serena y la Vega del Guadiana en Badajoz. Por ello la raza ibérica tuvo que adaptarse a cada una de las condiciones que le imponía el terreno, siendo este poder de adaptación al medio una de las características más importantes y determinantes que influyeron en la formación del cerdo ibérico. Ello ha dado lugar a que dentro de la raza ibérica se definan diferentes variedades. No obstante, el cerdo ibérico mantiene unas características comunes, independientemente de la variedad a que pertenezca y que también sirvan de punto diferencial con sus hermanos europeos derivados de las razas celtas.

Entre las más importantes se encuentran crecimiento lento, dorso muy arqueado, ojo poco manifiesto y pequeño, oreja mediana, vientre descendido, extremidades finas y jeta alargada. Analizando el censo europeo, se comprueba que entre los 118,3 millones de animales, destacan países como Alemania, con 24,1 millones de cabezas, Francia con 15 y Holanda con 14,2 millones de cabezas. España, por su parte, con un efectivo de 18,7 millones de cabezas representa un 16% del total de la Unión Europea. De estos cerdos, 990.085 son criados en régimen extensivo, por lo cual se puede deducir que la mayoría pertenecen a la raza ibérica (Rosselló et al., 2003).

De forma general y a modo de resumen, en la Figura 1 se muestran las variedades del cerdo ibérico (Diéguez, 1999).



Figura 1. Variedades del cerdo ibérico. Tomado de Diéguez (1999).

1.1.3. Hábitat: la importancia de la dehesa.

Toda las características propias del cerdo ibérico e deben a la admirable adaptación que éste ha tenido con el medio donde se ha desarrollado, llegando a tener un acoplamiento tan íntimo con él que ha modificado su identidad individual hasta constituir un binomio indisoluble del que dependen todas sus generosas cualidades (Rosselló et al., 2003).

Las características intrínsecas de las zonas que ocupa el cerdo ibérico se corresponden con un área de bosque mediterráneo donde predominan las grandes dehesas de encinas y alcornoques básicamente, pero de escasos recursos pastables y sobre todo, estacionales (Gaspar et al., 2007). Este medio es conocido como “dehesa”, y se da en el cuadrante sudoeste de la Península Ibérica, ocupando una extensión de 5,8 millones de hectáreas en España y 0,5 millones de hectáreas en Portugal (Gaspar et al., 2007). Estas condiciones limitantes forzaron a que el cerdo ibérico evolucionara drásticamente para adaptarse a su medio. Para ello, en su conformación fue destacando la finura de sus extremidades, que lo capacitaban para recorrer grandes distancias y procurarse una alimentación que no disponía en sus proximidades, razón que le obligaba a realizar grandes desplazamientos; y a pesar de ello, el equilibrio alimenticio no era adecuado (carencias minerales, vitamínicas y proteínicas) lo

que contribuía a su vez a que el crecimiento y la conformación de adulto se produjera lentamente (Rosselló et al., 2003).



Figura 2. Imagen de la Dehesa. Tomada de <http://www.juntaex.es>

Una de las creencias más difundidas en torno al cerdo ibérico es la de tener los pelos distales y la pezuñas negras para garantizar la pureza racial. Esa teoría se debe a la ya antigua moda del “Pata Negra”, término que se ha identificado como sinónimo de calidad y que tanto ha contribuido a la expansión publicitaria de los cerdos ibéricos. Sin embargo, esta aseveración no es exacta, puesto que hay variedades de cerdos ibéricos con la zona pilosa distal clara y pezuñas despigmentadas (Manchado de Jabugo, algunos ejemplares de torbiscales y de rubio andaluz); así como cerdos precoces o “blancos” que mantienen estos elementos oscuros (Duroc-Jersey, Negro Belga o Large Black) lo cual ha dado lugar a situaciones confusas e incluso fraudulentas. Es preciso, sin embargo, significar que los cerdos ibéricos presentan una “pata” si no siempre negra, sí la más de las veces oscura.

Otra de las regiones anatómicas que sufre transformaciones más bruscas es la cabeza, manifestándose un ojo más pequeño pero con mayor protección que el estándar clásico de cerdo blanco, y prolongando a la vez que endureciendo la jeta, de forma que pudiera facilitarle la búsqueda de los escasos alimentos a mayor profundidad.

El crecimiento característico “en bola” con el dorso más arqueado se debe también a la escasez de nutrientes disponibles, que conlleva a una aportación deficiente de elementos plásticos capaces de construir una base ósea lo

suficientemente consistente que permita un crecimiento más alargado, como ocurre con otras razas porcinas.

La adaptación morfológica que realizó el cerdo ibérico va unida a unas diferencias metabólicas que permiten una mayor separación entre las distintas razas porcinas. El ibérico tiene un funcionamiento particular hipoplásico de la glándula hipofisaria, que es una glándula de secreción interna que regular a su vez a la mayoría de las glándulas responsables del metabolismo hormonal. Este hecho provoca como resultado que el cerdo ibérico tenga un crecimiento lento, por tanto poca precocidad y a su vez posea una gran capacidad de acumulación de grasa en aquellos períodos en los que la alimentación es abundante, favoreciendo con ello el almacenamiento de sustancias grasa durante la época de cebo (Rosselló et al., 2003).

1.1.4. Influencia de la dieta: principales ácidos grasos.

La grasa depositada en el cerdo puede ser de origen endógeno, sintetizada a partir de los hidratos de carbono de la dieta, o exógeno, asimilando las grasas de los alimentos que consume (De Pedro, 1999). A diferencia de los rumiantes que tienen el estómago dividido, la mayoría de los animales monogástricos y si cabe de forma más acentuada el cerdo ibérico, transmiten a sus depósitos grasos y musculares las características propias de los alimentos que componen su dieta sin sufrir modificación. De ahí la significación o importancia del consumo de bellotas u otros productos diversos en la fase de cebo o final del ciclo de explotación porcina, ya que los lípidos asimilados van a ser responsables de las características organolépticas de la carne: sabor, aroma, ternura, jugosidad, etc.) (De Pedro, 1999, Rosselló et al., 2003).

Las características principales que aporta la bellota a las canales de cerdo ibérico, por tanto, son debidas a la propia composición del fruto en donde destacan los ácidos grasos monoinsaturados y de forma especial el ácido oleico, cuyos niveles se aproximan a los que posee la aceituna de almazara. Además del ácido oleico, nos encontramos en la bellota los ácidos palmítico, palmitoleico, esteárico, linoleico y linolénico, siendo los más representativos e influyentes junto con el oleico, el palmítico, el esteárico y el linoleico (Rosselló et al., 2003). Las canales de cerdos ibéricos son evaluadas en el mercado según la proporción de ácidos grasos mayoritarios en la capa más exterior de

la grasa subcutánea, siendo las canales de mayor calidad las que tienen mayor porcentaje de ácido oleico C18:1 *n*-9 (>53-54%), y proporciones de palmítico (C16:0), esteárico (C18:0) y linoleico (C18:2 *n*-6) por debajo del 21,0%, 9,5% y 9,5%, respectivamente. Carnes y productos cárnicos obtenidos de cerdos Ibéricos alimentados exclusivamente en condiciones extensivas (alimentación en *montanera*) alcanzan precios mucho más altos en el mercado que otros cerdos ibéricos alimentados con dietas concentradas y en confinamiento (Daza et al., 2007).

Table 2
Summary of the data for the analysed traits

	<i>N</i>	Mean	SD	CV	Min.	Max.
<i>Carcass traits</i>						
Hams, kg	2553	20.16	2.05	10	12.40	28.30
Forelegs, kg	2552	13.51	1.46	11	8.70	19.70
Loins, kg	2170	3.03	0.51	17	1.23	5.08
<i>Meat and fat quality traits</i>						
Intramuscular fat content (IMF), %	1489	9.76	2.99	31	3.26	24.73
C16:0, %	1495	21.36	1.35	6	14.39	27.08
C18:0, %	1495	10.34	1.00	10	6.67	14.57
C18:1, %	1495	52.40	2.35	4	43.34	64.29
C18:2, %	1495	9.40	0.68	7	6.85	12.27
<i>Covariates</i>						
Age at slaughter, days	2553	491	30	6	409	599
Carcass weight, kg	2553	131.11	16.51	13	68	193
Increase of weight, kg	2492	61.12	15.36	25	11	117

Figura 3. Resumen de diferentes características analizadas en carne de cerdo ibérico. Tomado de Fernández et al. (2003).

Aunque la composición de ácidos grasos en el tejido adiposo del cerdo ibérico está condicionada por numerosos factores, como pueden ser la raza y el sexo del animal, está científicamente demostrado que esta composición de ácidos grasos en la grasa subcutánea es diferente para animales alimentados en *montanera* y *cebo*, conteniendo el tejido adiposo de los cerdos alimentado en *montanera* niveles mayores de ácido oleico, tanto en productos frescos como curados, procedente del alto contenido de ácido oleico presente en las bellotas (Niñoles et al., 2007).

1.2. EL MÚSCULO ESQUELÉTICO.

La única característica del músculo esquelético es su diversidad. No existen dos músculos idénticos dentro del mismo animal, y músculos homólogos presentan diferencias entre especies y razas (Karlsson et al., 1999).

El tejido muscular es responsable del movimiento del cuerpo y está compuesto por células multinucleadas llamadas fibras musculares. Éstas se extienden a lo largo del músculo y están organizadas en miofibrillas (Karlsson et al., 1999). Existen tres tipos fundamentales de músculos desde un punto de vista histológico: músculo liso, músculo cardíaco y músculo estriado o esquelético. De forma muy general podemos decir que el músculo liso se localiza en el tracto digestivo y es de gran importancia en los procesos de la digestión y absorción de nutrientes y también parte estructural de las venas y vasos sanguíneos. Se trata de fibras musculares de contracción involuntaria y no presentan estriación al microscopio, a diferencia de las fibras cardíacas y musculares (Fawcett, 1987; Fennema, 2000).

El músculo cardíaco constituye el tejido muscular del corazón y en algunas venas en donde se requiere presión para favorecer el movimiento de la sangre. Su contracción es involuntaria y las fibras musculares que lo constituyen son más pequeñas y cortas que las fibras musculares (Fawcett, 1987; Fennema, 2000).

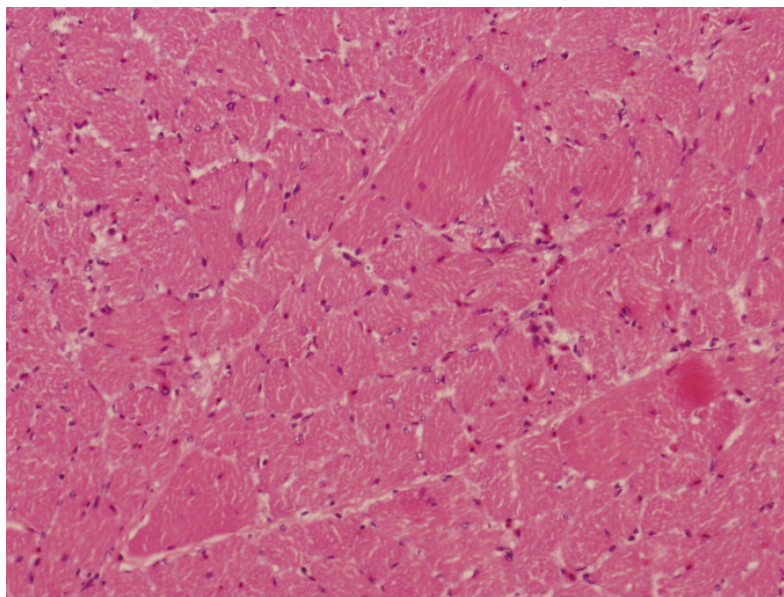


Figura 4. Corte histológico transversal de fibras musculares típicas teñidas con hematoxilina-eosina y observadas al microscopio con objetivo de 20 aumentos.

El músculo estriado o esquelético recibe este nombre debido a la estructura estriada distribuida regularmente a lo largo de las fibras musculares. Los músculos esqueléticos están compuestos de haces de fibras musculares envueltas en tejido conectivo. Su principal componente es la célula muscular o fibra muscular. Además de estas fibras musculares, el músculo está constituido por tipos celulares del tejido vascular, conectivo, adiposo y nervioso (Fawcett, 1987; Fennema, 2000).

1.2.1. Composición del músculo esquelético.

Desde un punto de vista molecular, el agua va a ser el componente mayoritario en las carnes, al igual que en todos los seres vivos. El músculo está compuesto por un 75% de agua, un 20% de proteína, un 3% de grasa y un 2% de sustancias solubles no proteicas (Tornberg, 2005). El tejido muscular de cerdo después del rigor mortis tiene una media del 75% de agua, 22% de proteína y diferentes cantidades de lípidos y carbohidratos, según su raza y variedad (Karlsson et al., 1999).

De los componentes no acuosos del músculo, el más importante es el proteico. Las proteínas musculares pueden clasificarse en 3 grupos diferentes: miofibrilares, sarcoplásmicas y del tejido conectivo (Tornberg, 2005). Las proteínas miofibrilares constituyen la fracción más importante, con un 50-55% del total del contenido proteico. Las proteínas sarcoplasmáticas representan un 30-34% del total de proteínas. Forma parte de esta fracción la mioglobina, que es un pigmento del músculo, y diferentes enzimas responsables del metabolismo energético. Las proteínas del tejido conectivo o del estroma representan el 10-15% del total, siendo las más abundantes el colágeno y la elastina, componentes principales del tejido conectivo (Karlsson et al., 1999, Tornberg, 2005).

1.2.2. Tipos de músculos.

La clasificación más antigua para la clasificación del músculo es la propuesta por los autores Ranvier, Needham y Brown, basada en el color de los músculos (rojo y/ blanco), el cual se relaciona directamente con la concentración de mioglobina y el suministro sanguíneo del músculo. Los músculos rojos poseen

grandes cantidades de mioglobina, debido a que estos músculos tienen unos elevados requerimientos de oxígeno. Para la obtención de energía es necesaria la presencia de oxígeno y se hace posible gracias a que la abundante mioglobina almacena grandes cantidades del mismo. Constituyen las llamadas fibras de contracción lenta, ya que estas células que obtienen la energía por vía aeróbica (en presencia de oxígeno) tienen un ciclo de contracción-relajación lento, pero que puede mantenerse durante muchas horas a lo largo del tiempo, como en migraciones o el mantenimiento de la postura. Por contra, en los músculos blancos apenas se encuentra mioglobina, siendo su coloración mucho más clara. Estos músculos van a obtener la energía necesaria para la contracción por rutas energéticas en donde no hace falta oxígeno (rutas anaeróbicas) y por tanto no es necesaria la presencia de tanta mioglobina en el músculo. Estas fibras son conocidas como fibras de contracción rápida, ya que la energía es suministrada al músculo instantáneamente. Esta fibra genera una gran fuerza muscular, permitiendo al animal unos movimientos rápidos y potentes, pero durante muy poco tiempo, ya que el agotamiento de la fibra muscular es muy alto (Pearson & Young, 1989; Ramírez, 2004). Histoquímicamente mediante tinción con Sudán negro también podemos clasificar las fibras musculares como fibras rojas y blancas (Karlsson et al., 1999).



Figura 5. Chuletón de vacuno mayor.

La mayoría de los músculos son de composición heterogénea y están formados por varios tipos de fibras y su composición depende de las funciones que debe realizar el músculo.

a) Músculos de contracción lenta y oxidativos. Son lentos en contraerse como respuesta a un estímulo. Son músculos responsables del mantenimiento de la postura corporal y están implicados en la realización de movimientos repetitivos y lentos con el menor gasto de energía. Contienen un elevado número de mitocondrias e hidrolizan el ATP muy lentamente, de modo que son muy resistentes a la fatiga.

b) Músculos de contracción rápida y glicolíticos. Responden rápidamente ante un estímulo y también se relajan más rápidamente al cesar el estímulo. Presentan una actividad miosina ATPasa muy alta y se utilizan cuando se requiere movimiento rápido., pero se fatigan muy rápidamente. Contienen muy pocas mitocondrias.

c) Músculos de contracción rápida y oxidativos. Son similares a los glicolíticos en la velocidad de contracción, aunque en general tienen velocidad de acortamiento ligeramente lenta. Contienen mayor número de mitocondrias que los glicolíticos y se recuperan con más rapidez de los efectos del ejercicio. Están adaptados para realizar movimientos rápidos de naturaleza repetitiva y son los primeros que se utilizan después de los lentos oxidativos.

1.2.3. Tipos de fibras musculares.

En base a la tinción histoquímica de ATPasa miofibrilar podemos observar dos tipos de fibras musculares: tipo I y tipo II. Las fibras tipo I tienen un alto contenido de enzimas mitocondriales y baja actividad miofibrilar ATPasa y fosforilasa. El patrón inverso es observado en las fibras tipo II. Brooke & Kaiser (1970) agruparon las fibras tipo II en 3 subclases según la tinción ATPasa después de la preincubación ácida: IIA, IIB y IIC. Se ha encontrado una relación lineal entre la actividad miosin ATPasa y el porcentaje de contracción de la fibra muscular (Karlsson et al., 1999).

La capacidad oxidativa de las fibras musculares puede ser evaluada por la tinción NADH-tetrazolium reductasa o por la actividad succinato deshidrogenasa (SDH), pudiendo definirse las fibras musculares por su comportamiento fisiológico durante la contracción. Así podemos clasificar las

fibras musculares como de contracción lenta y oxidación alta (lentas oxidativas), de contracción rápida y oxidación rápida (rápidas oxidativas) y de contracción rápida y oxidación lenta (rápidas glucolíticas). Estos tipos de fibras son definidos como rojas- β , rojas- α y blancas- α , y se han encontrado fuertes correlaciones entre con los tipos I, IIA y IIB en músculos porcinos, siendo el tipo IIC una transición entre los tipos I y II, encontrada en individuos recién nacidos y en procesos de reparación muscular. La edad del animal y sobre todo la genética van a determinar los posibles tipos de fibras que encontraremos en el músculo (Karlsson et al., 1999; Ruusunen & Puolanne, 2004).

La composición de las fibras depende de diversos factores como la especie, tipo de músculo, dieta, actividad física y temperatura ambiente, que afecta durante el desarrollo del metabolismo energético (Essén-Gustavson & Fjellner-Modig, 1985; Karlsson et al., 1993; Sosniki, 1998; Lefaucheur & Gerrard, 1998).

1.2.4. Fibras musculares esqueléticas y proteínas miofibrilares.

El tejido muscular esquelético analizado al microscopio óptico presenta una arquitectura ordenada compuesta por células de gran tamaño, largas, estrechas y multinucleadas que miden desde unos pocos a varios centímetros de longitud y de 10 a 100 μm de diámetro, llamadas fibras musculares (Fennema, 2000). Presentan capacidad contráctil y están compuestas por unas estructuras largas, paralelas y con forma cilíndrica que reciben el nombre de miofibrillas. Estas estructuras fibrilares están formadas por 2 proteínas, la actina y la miosina, que se desplazan la una sobre la otra provocando la contracción de la fibra muscular y constituyendo lo que se llama el complejo actomiosina. La sumatoria de acortamientos y alargamientos de todas las fibras musculares es lo que va a provocar el alargamiento o acortamiento del músculo en su conjunto (Fennema, 2000, Tornberg, 2005).

Las fibras musculares contienen muchas agrupaciones paralelas de miofibrillas provistas de bandas transversales claras y oscuras alternantes, por lo que recibe el nombre de músculo estriado. Esta apariencia estriada se debe a la distribución repetitiva específica de las proteínas de las miofibrillas: la actina y la miosina. Las bandas oscuras de las fibrillas son anisótropas o birrefringentes cuando se observan con luz polarizada. Por ser anisótropas se les denomina "bandas A". Las bandas que aparecen más claras son isotropas y, por tanto, se

denominan “bandas I”. En el centro de cada banda I existe una línea oscura denominada línea o disco Z. El término Z deriva del vocablo alemán “zwischen”, que significa “entre”. Frecuentemente, en el centro de la zona H existe la línea M, más oscura. La unidad contráctil de la fibrilla se denomina sarcómero y se define como el material localizado entre los discos Z adyacentes, a los que incluyen (Fennema, 2000).

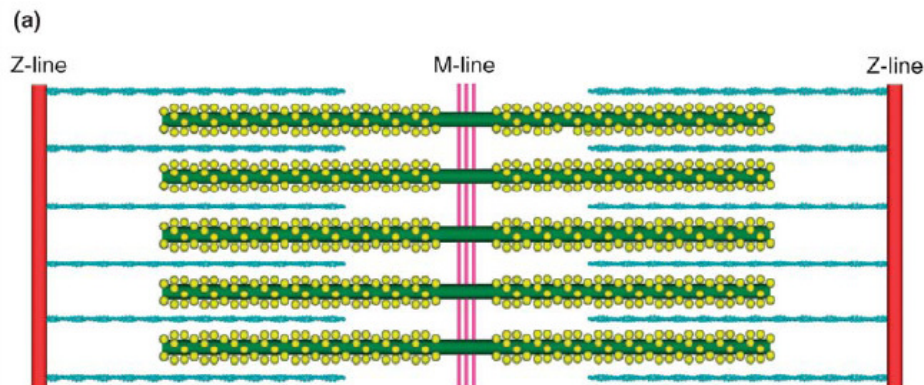


Figura 6. Sarcómero de músculo estriado mostrando el solapamiento entre los filamentos de actina y miosina. Tomado de Craig & Woodhead (2006).

Un sarcómero está formado por filamentos longitudinales gruesos y delgados. Los filamentos finos son acúmulos lineales poliméricos de moléculas de actina globular enrollados en doble hélice que están anclados por uno de sus extremos a las estructuras transversales densas antes denominadas bandas Z. Los filamentos gruesos están formados por 200-400 moléculas contráctiles de miosina que se encuentran engranadas sobre la actina y se fijan al retículo denominado banda M, situado longitudinalmente a la fibra muscular. Es el llamado complejo de actomiosina, componente fundamental de la sarcómero. La banda A comprende filamentos gruesos (principalmente de miosina) y filamentos delgados (principalmente actina), en tanto que la banda I está compuesta de filamentos delgados. Los filamentos delgados se prolongan hacia derecha e izquierda de los discos Z en ambas direcciones y los filamentos delgados se solapan con los filamentos gruesos en partes de la banda A. La zona más clara de la banda A, la zona H, es un área donde los filamentos delgados no se solapan con los filamentos gruesos. El estado contráctil del músculo juega un papel importante en el tamaño de estas bandas

y zonas, puesto que durante la contracción los filamentos delgados y gruesos se deslizan los unos sobre los otros. Durante la contracción, la longitud de la banda A permanece constante pero la banda I y la zona H se acortan ambas (Fennema, 2000; Tornberg, 2005).

Los filamentos delgados están conectados a los discos Z y por esta razón el disco Z probablemente sirve como punto de anclaje durante el proceso contráctil. Cada filamento de la banda I está ligado a los 4 filamentos más próximos en el sarcómero adyacente. Esta unión compensa lateralmente a los filamentos delgados de un sarcómero con el próximo. La línea M está localizada en el área de los filamentos gruesos en la que las proyecciones de las cabezas de la miosina no están presentes. La línea M sirve para mantener los filamentos en la posición geométrica correcta (Fennema, 2000).

1.2.5. Proteínas sarcoplasmáticas.

Son en su mayoría enzimas relacionadas con el metabolismo energético y respiratorio de la fibra muscular (Fennema, 2000) y son las proteínas solubles del sarcoplasma (Tornberg, 2005). La más importante de ellas va a ser la mioglobina, encargada del almacenamiento de oxígeno dentro de la célula y responsable última del color de la carne fresca (Karlsson et al., 1999). En posteriores apartados de esta introducción se estudia con más detalle el importante caso de la mioglobina.

1.2.6. Tejido conectivo intramuscular.

Componente fundamental de los músculos, el tejido conectivo actúa como nexo de unión entre todos los componentes de músculo y, en general, del organismo. Su morfología, composición y cantidad varía enormemente entre músculos, especies, razas y edad del animal, jugando un papel importante por su contribución a la dureza de fondo de la carne. El tejido conectivo intramuscular es, probablemente, la diferencia fenotípica más variable entre músculos dentro de un animal (Purslow, 2005).

El tejido conectivo está formado por diversos tipos de fibras tipos celulares diferentes y la sustancia fundamental amorfa, también denominada lámina basal. Los tejidos conectivos mantienen y soportan los músculos mediante los tendones, epimisio, perimisio y endomisio (Fennema, 2000, Tornberg, 2005).

Presenta un color blanquecino y forma una extensa y organizada red que rodea a las fibras musculares. Se organiza alrededor de éstas y da soporte a los vasos sanguíneos, los nervios, la grasa y, a través de los tendones, conecta el músculo a los huesos, en donde actúan como palanca para movilizar al organismo (Fawcett, 1987; Purslow, 2005).

El tejido conectivo intramuscular está compuesto mayoritariamente de fibras de colágeno, que son las responsables de la dureza de la carne. Las grandes diferencias de precio entre piezas musculares diferentes reflejan las expectativas del consumidor a la hora de realizar la compra. Esta diferencia de calidad es debida en gran parte a las diferentes cantidades de tejido conectivo intramuscular que se presentan en cortes cárnicos distintos, ya que va a influenciar en gran medida la dureza de la carne tras el cocinado debido a la estabilidad térmica y mecánica de este tejido conectivo intramuscular (Tornberg, 2005; Purslow, 2005).

El tejido conectivo intramuscular abarca principalmente a las fibras de las proteínas de colágeno y elastina, rodeadas por una matriz de proteoglicanos. Éstas en realidad están formadas por la agrupación de múltiples moléculas de una proteína fibrilar llamada colágeno, que es el componente extracelular principal del tejido conectivo (Fawcett, 1989, Fennema, 2000, Purslow, 2005). Se trata de una glicoproteína compuesta por monómeros de tropocolágeno, los cuales se agregan para formar una extensa red de fibras (Tornberg, 2005). El total del contenido de colágeno en músculos de vaca puede variar entre el 1% y el 15% del peso seco. Pero junto a las fibras de colágeno coexisten, aunque en mucha menor cantidad, otros dos tipos de fibras en el tejido conectivo intramuscular: las fibras elásticas y las fibras de reticulina. Hacer mención a las fibras de elastina, otro tipo de fibras dentro del tejido conectivo intramuscular y que son capaces de aguantar estiramientos de hasta el 200% sin romperse, interviniendo en el retorno del músculo a su posición de reposo una vez que cesa la contracción. Las fibras de reticulina son una variedad particular de filamentos de colágeno entrelazados para formar una red en torno al sarcoplasma de las fibras musculares estriadas y constituyen entre el 0,6% y el 3,7% del peso seco. Estas fibras tienen mucha más importancia en tejidos formados por células desprovistas de endomisio como ocurre en el hígado y los órganos linfoides, y son muy abundantes en los vasos sanguíneos y en los

ligamentos. Estas fibras de elastina son tremendamente resistentes al calor (Fawcett, 1989; Fennema, 2000; Flint, 1994; Purslow, 2005).

Observando el músculo al microscopio es posible observar la organización arquitectural de las fibras musculares y del tejido conectivo que las soporta, responsables directos de la textura de la carne y de sus peculiaridades al aplicarle un tratamiento térmico. Cada fibra muscular está envuelta en una delgada capa de tejido conectivo llamada endomisio que la independiza del resto de células y cuya función es nutrir y dar soporte físico a la fibra, acoplando y transmitiendo su fuerza de contracción al resto de las estructuras conectivas intramusculares, otorgando a las fibras musculares una alta capacidad de reorientación durante la contracción. De este modo, los endomisios de todas las fibras de un músculo determinado forman una red de tejido conectivo parecida a un panal de abejas, con un tamaño de 47-48 nm. (Lepetit, 2007), donde cada fibra muscular se aloja dentro de su correspondiente cavidad (Fennema, 2000; Purslow, 2005).

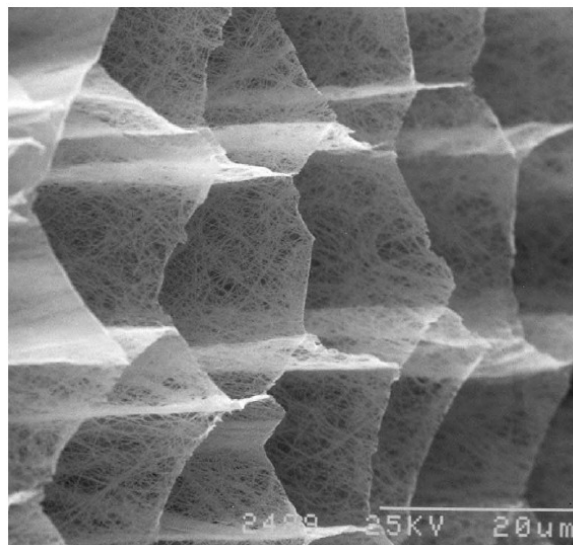


Figura 7. Micrografía electrónica de barrido de la red endomisial en el músculo *sternomandibularis* de carne de vacuno después de la extracción del componente miofibrilar por NaOH. Tomada de Purslow (2005).

A su vez, las fibras musculares con su endomisio particular se agrupan en haces para formar los fascículos musculares primarios y secundarios, que sucesivamente quedan rodeados por capas más gruesas de tejido conectivo

que reciben el nombre de perimio primario y secundario, con un tamaño medio de 65-67 nm. (Lepetit, 2007). Las fibras de colágeno en el perimio están organizadas en una configuración de láminas cruzadas en dos conjuntos de fibras de colágeno onduladas, con las fibras de cada lámina paralelas a las otras pero en un ángulo de 54° con el eje de la fibra muscular. Su cuya misión es, además de la nutrición celular y la transmisión de los impulsos nerviosos, permitir el fácil acortamiento/alargamiento de los fascículos musculares al contraerse y relajarse.

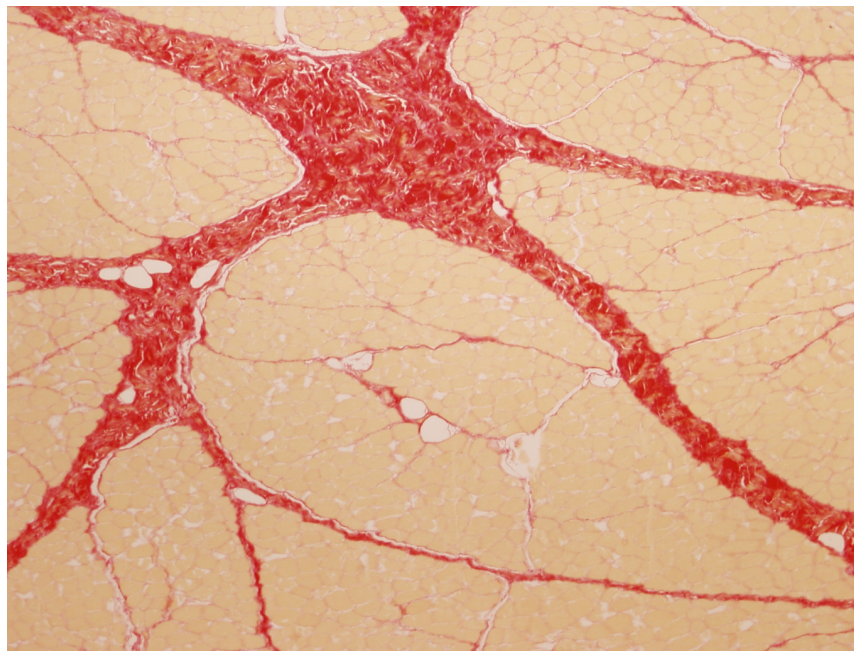


Figura 8. Tejido conectivo intramuscular de músculo *masseter* en ganado vacuno, observado con tinción de rojo Sirio y con objetivo de 4 aumentos.

La tercera y última envoltura conectiva es el epimio, que recubre externamente al músculo y lo delimita como tal, protegiéndolo y otorgándole mayor movilidad frente al contacto con otros músculos o estructuras vecinas. En muchos músculos, las fibras de colágeno del epimio emplean la misma organización en doble lámina cruzada que en el perimio (Cotran et al., 2000, Fennema, 2000; Purslow, 2005).

Aunque endomio, perimio y epimio constituyen lo que tecnológicamente se conoce como tejido conectivo intramuscular de las carnes, desde un punto de vista tecnológico y gastronómico el de mayor relevancia es el perimio (Lepetit

et al., 1994). Es el más abundante porcentualmente y el principal determinante de la textura elástica y fibrosa de la carne y responsable del 30-40% de la variación en la fuerza necesaria para su masticación (Lepetit et al., 1994). Además es en el perimio en donde se acumula la mayor parte de la grasa intramuscular, responsable de la palatabilidad de la carne. Por el contrario, el epimio es la capa conectiva de menor importancia gastronómica, puesto que por su localización en el exterior suele ser separado de la pieza durante su manipulación en la carnicería o la cocina, no contribuyendo a la textura final tras el cocinado.

El contenido de colágeno del perimio varía enormemente entre músculos dentro de un mismo animal (Lepetit et al., 1994; Nakamura et al., 2003; Purslow, 1999). Light et al. (1985) observan en músculos de ganado vacuno que, mientras que el porcentaje de colágeno en peso seco varía entre un 0,1% y un 0,5% en el endomio, la variación en el perimio del mismo músculo está entre el 1,4% y el 7,0% (Lepetit et al., 1994). Diversos estudios afirman que la variación del contenido de colágeno en los músculos es debida en gran parte a la diferente funcionalidad de los mismo (Light et al., 1985; Purslow, 1989).

Las correlaciones entre técnicas físicas de texturometría, como por ejemplo el test Warner-Bratzler de fuerza de cizalla, y el contenido de colágeno son pobres (Purslow, 2005). Dransfield (1977) muestra algunas correlaciones entre texturometría en carnes cocinadas y contenido de colágeno medido como concentración de hidroxiprolina, pero no son suficientes para explicar más de la mitad de la variación total en la textura. Otros estudios sobre carne de vaca cocinada han demostrado claramente que la separación entre perimio y endomio de las fibras de la superficie del fascículo es relativamente fácil de conseguir tras la aplicación de tratamiento térmico, pero las capas individuales de perimio son fuertes y dominan la evolución de la carne tras el cocinado y, por tanto, su dureza (Carroll et al, 1978; Lewis et al., 1991; Purslow, 1985). Diversos autores (Brooks et al., 2004; Carpenter et al., 1963; Cooper et al., 1968; Light et al., 1985; Purslow, 1999; Swatland et al., 1995) confirman que perimios de más gruesos están asociados a menor ternura de la carne. Este hecho, junto a la edad de los animales (existencia de enlaces cruzados de colágeno, como se verá más adelante) y la relación colágeno tipo I:III será determinante en la dureza de la carne (Bailey et al., 1998).

1.2.6.1. La fibra de colágeno.

Las proteínas del tejido conectivo son las que conforman el andamiaje responsable de dar resistencia al músculo frente a la contracción muscular y definen la estructura y compartimentalización del tejido muscular. La más importante dentro de este grupo es el colágeno, que es el componente mayoritario del tejido conectivo, representando un tercio del total de las proteínas en los mamíferos, el 10% de las proteínas musculares y más del 90% del tejido conectivo intramuscular (Fennema, 2000; Purslow, 2005).

El colágeno existe en los organismos puede presentarse como gruesas fibras estriadas, redes no fibrosas en membranas basales, estructuras filamentosas no estriadas o fibras asociadas a moléculas (Bailey et al., 1998). La molécula de colágeno en su estado nativo es rígida e inextensible y está compuesta por 3 cadenas fibrilares más simples de tropocolágeno enrolladas sobre sí mismas formando una hélice y constituida por una estructura básica repetitiva de 3 polipéptidos: Gly-X-Y. (Bailey et al., 1998). Esto facilita su agrupación sucesiva hasta formar gruesos tabiques o tendones, responsables directos de su especial resistencia al corte y a la masticación cuando la carne está cruda. Esta proteína tiene como finalidad principal la resistencia frente a tensiones, y es tal su capacidad que, a igualdad de grosor, resiste más que el acero inoxidable. Hay 19 tipos de colágeno diferentes según la composición de aminoácidos que forman la molécula de colágeno y cada uno tendrá funciones y localizaciones específicas. Los colágeno tipo I, III, IV, V, VI, XII y XIV han sido identificados en el tejido conectivo intramuscular (Bailey et al., 1998; Tornberg, 2005).

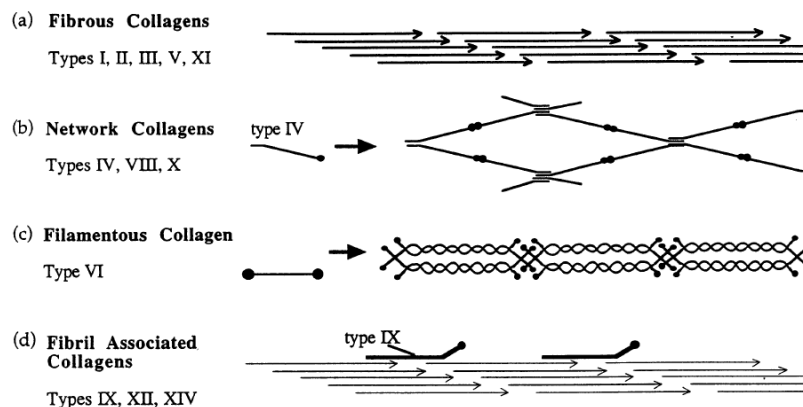


Figura 9. Tipos de fibras de colágeno. Tomada de Bailey et al. (1998).

De entre estos, los tipos más relevantes son el colágeno tipo I y III, que son formadores de fibra en epimisio, perimisio y endomisio, y el colágeno tipo IV, que es el principal componente no formador de fibra en el endomisio, responsable de la unión de la membrana basal con la capa fibrosa reticular del sarcolema de las fibras musculares. En mamíferos, el colágeno tipo V es un componente minoritario del tejido conectivo intramuscular, aunque es mucho más abundante en la estructura del tejido conectivo intramuscular de peces, llamada *myocommata* (Fennema, 2000, Purslow, 2005). El colágeno tipo III tiene especial relevancia por el papel que juega en la compactación de las fibras de colágeno con la edad del animal mediante la formación de enlaces cruzados (Bailey et al., 1998), que otorgan mayor o menor dureza a la carne como se describe posteriormente.

1.2.6.2. Enlaces cruzados del colágeno.

Los enlaces cruzados o *crosslinks* son el factor de mayor importancia en la estabilidad tanto térmica como mecánica del tejido conectivo intramuscular. Son generados conforme crece el animal entre las moléculas vecinas del colágeno y estabilizan su estructura (Bailey et al., 1998). Son responsables de gran parte de la dureza del tejido conectivo intramuscular de la carne cocinada, pues forman una extensa red polimérica de colágeno con enlaces resistentes a la acción del calor.

Estos enlaces cruzados se forman por diferentes vías, siendo en cualquier caso la edad del animal el factor de mayor importancia en la formación de los mismos. Los enlaces de colágeno inmaduros o divalentes evolucionan a un estado trivalente al aumentar la edad del animal, conociéndose como enlaces maduros de colágeno y manteniendo uniones con las miofibrillas, aumentando la fuerza mecánica de la misma. Mediante estos procesos de reacción cruzada disminuye la flexibilidad del tejido conectivo intramuscular, se impide la renovación de su colágeno y se incrementa su estabilidad mecánica y térmica (Bailey et al., 1998 Fennema, 2000).

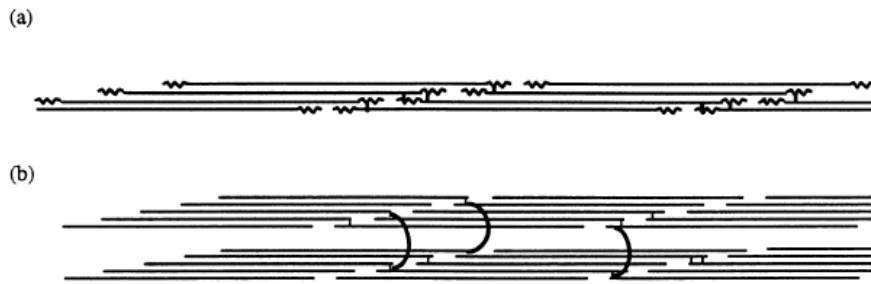


Figura 10. a) Localización de los enlaces maduros divalentes alineados en fibras de colágeno inmaduras. b) Localización de los enlaces maduros trivalentes derivados de enlaces divalentes inmaduros, en donde existe conexión con las miofibrillas. Tomada de Bailey (1998).

Para solucionar esta alta estabilidad térmica y mecánica que otorgan los enlaces cruzados al tejido conectivo intramuscular vamos a tener que llevar a cabo maduraciones más largas en cámara frigorífica y tratamientos térmicos más intensos para lograr la desnaturalización del colágeno a gelatina y conseguir que el tejido conectivo intramuscular pierda su alta resistencia al masticado, en especial en carnes procedentes de animales de mayor edad (Torrescano et al., 2003).

Los enlaces cruzados del colágeno pueden formarse por vía enzimática y por vía química. El método enzimático es directo, específico y se desencadena el primero con el paso del tiempo. Consiste en transformar los enlaces divalentes poco intensos que existen entre las diferentes moléculas adyacentes de colágeno en enlaces cruzados trivalentes de alta estabilidad, por lo común sobre residuos del aminoácido lisina a través de la actuación de la enzima oxidasa de lisina. En la vía química (indirecta, inespecífica y que progresa con la edad del animal) la glucosa interacciona lentamente y de forma espontánea con el grupo amino de la lisina del colágeno empleando para ello una reacción de Maillard, que se da a la temperatura corporal del animal. Este proceso, conocido como glicación, es especialmente importante en las proteínas de larga vida, como el colágeno maduro (Bailey et al., 1998).

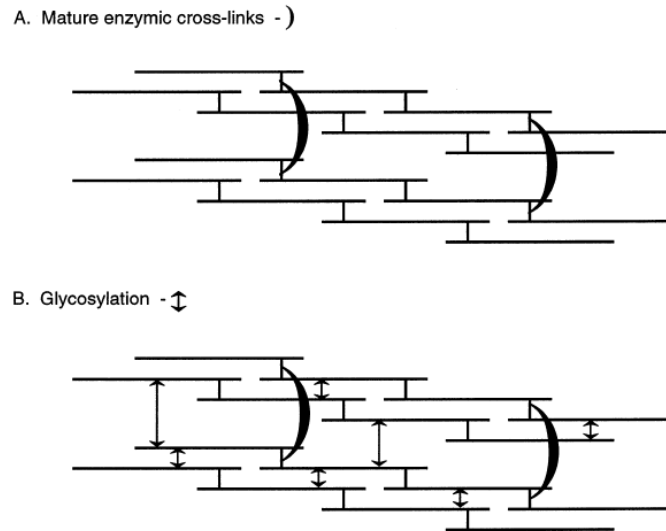


Figura 11. Resumen de la localización de los enlaces cruzados en diferentes estados de madurez del animal: inmaduros (|), maduros (|) y senescentes por glicación (⚡). Tomada de Bailey et al. (1998).

Estos hechos asocian la madurez del animal con una mayor estabilidad térmica y mecánica del tejido conectivo intramuscular (Bailey et al., 1989). La ternura de la carne normalmente decrece con la edad del animal, siendo especialmente relevante en músculos con mayor cantidad de tejido conectivo intramuscular (Shorthose et al., 1990), como es el caso de la carrillera de cerdo. De forma general, está aceptado que el desarrollo de enlaces cruzados maduros en el tejido conectivo intramuscular conforme aumenta la edad del animal aumenta de forma notable la dureza de las carnes cocinadas (Bailey et al., 1989, McCormick, 1994).

Dos situaciones fisiológicas especiales que afectan de manera muy importante a la formación de enlaces cruzados entre las moléculas de colágeno son la castración de los machos y la alimentación intensiva de los animales. En el primer caso, en la castración de los cerdos macho que se realiza para prevenir los olores desagradables en la carne (conocidos como *tufo a verraco* y debidos a la presencia de androstenona y escatol en la grasa, 5-alfa-androst-16-en-3-ona y 3-metilindol, respectivamente) se ha observado que existen menos enlaces cruzados trivalentes, así como una menor cantidad de tejido conectivo intramuscular en la carne, lo que le hace más blanda. La mayor presencia de colágeno tipo III, un tipo especial de colágeno en el tejido conectivo

intramuscular de los cerdos sin castrar favorece la formación de enlaces cruzados y el aumento de la dureza de la carne como reflejo de la mayor actividad metabólica del animal mediada por la testosterona (Zamaratskaia et al., 2004).

La otra situación fisiológica especial que afecta a la dureza de la carne es la alimentación intensiva, circunstancia durante la cual en el animal se produce un desarrollo muscular acelerado, mediado por la facilidad de engorde de algunas razas. Durante el mismo se observa un aumento de la capacidad de renovación del tejido conectivo, es decir, mayor capacidad de reparación y sustitución del tejido conectivo intramuscular. Este nuevo colágeno sustituye al antiguo y el número de enlaces cruzados maduros (trivalentes) será menor y por tanto la carne será más tierna, aunque menos sabrosa (Bailey et al., 1998).

1.2.7. Grasa intramuscular.

La grasa es el tercer gran componente estructural del músculo. Su acumulación en los animales se produce en forma de tejido adiposo, que está formado por las células adiposas o adipocitos, situadas generalmente en la periferia de los vasos sanguíneos del músculo. Estas células durante su crecimiento van acumulando pequeñas gotas de triglicéridos que por coalescencia forman una gran gota intracelular cuya función más importante es el almacenamiento de energía. Todas estas gotas lipídicas de pequeño tamaño aumentan por coalescencia y finalmente en la célula adiposa madura solo existe una gran gota de grasa. El citoplasma rodea la gota de grasa y los orgánulos subcelulares se localizan en la capa delgada de citoplasma. Las células adiposas se localizan fuera de los haces musculares primarios, esto es, en el perimisio y epimisio, pero nunca en el endomisio. Los lípidos en este último usualmente son los de las membranas, existiendo pequeñas gotículas de grasa distribuidas por la propia fibra muscular (Fawcett, 1987; Fennema, 2000).

La grasa intramuscular influye de manera determinante en la textura de las carnes, otorgándoles aroma, jugosidad, sabor y capacidad para lubricar la faringe y el esófago facilitando la deglución. La cantidad de grasa que acumula un animal depende de la edad, nivel de nutrición, ejercicio y de otros factores fisiológicos que funcionan en los músculos específicos en cuestión. En la mayor parte de los animales la grasa tiende a acumularse en el abdomen o

debajo de la piel, aunque con la edad y en determinadas especies, como puede ser el cerdo ibérico, está muy desarrollada la acumulación de grasa a nivel del perimio, fenómeno conocido como veteado de la carne (Fennema, 2000). Hablamos entonces de grasa intramuscular, con una gran influencia positiva en las características de textura y apariencia de la carne (Ramírez et al., 2007; Ruiz-Carrascal et al., 2000).

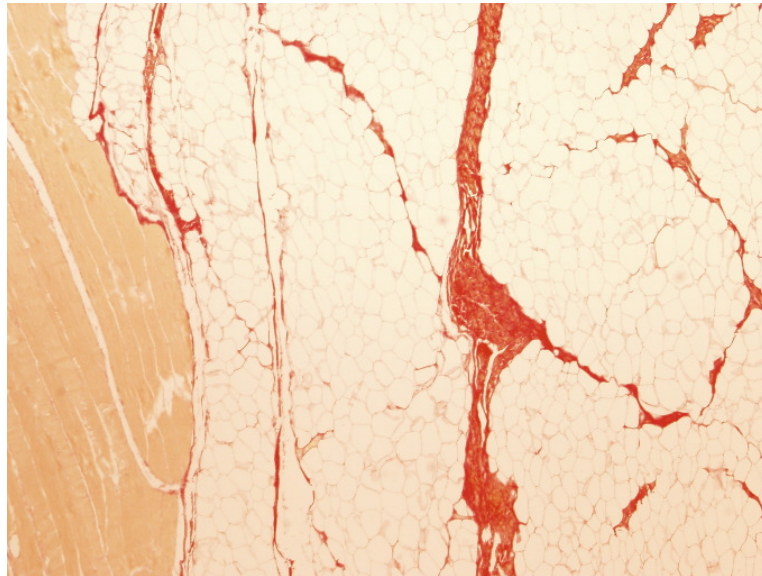


Figura 12. Corte histológico de carne de cerdo ibérico. Se puede observar una gran veta de grasa intramuscular sostenida por el tejido conectivo intramuscular. Tinción rojo Sirio observada con el objetivo de 4 aumentos.

Se sabe que la grasa intramuscular juega un papel decisivo en el desarrollo las características sensoriales de los productos frescos y curados del cerdo ibérico. Incrementar los niveles de grasa intramuscular está generalmente considerado como una forma de aumentar la calidad de la carne de cerdo, tanto en productos frescos como en curados (Ruiz-Carrascal et al., 2000; Ventanas et al., 2005, Ventanas et al., 2007). Altos contenidos de grasa intramuscular implican altos contenidos de triacilglicéridos y un menor contenido de fosfolípidos. Ruiz-Carrascal et al. (2000) correlacionan un mayor contenido de grasa intramuscular con menor contenido de ácidos grasos poliinsaturados y mayor contenido de ácidos grasos saturados. El desarrollo de oxidación de lípidos depende, en parte, tanto del contenido y composición de ácidos grasos

de la grasa intramuscular, así como altos niveles de ácidos grasos poliinsaturados aumentan la susceptibilidad de la carne frente a procesos oxidativos y de ranciedad (Cava et al., 1999).

1.2.8. El veteado de la carne de cerdo ibérico

Aunque el componente mayoritario en el músculo son las fibras musculares, especial relevancia tienen la grasa intramuscular y el tejido conectivo intramuscular, como ya hemos detallado en apartados anteriores. Y aunque visto desde otras especialidades científicas no lo parezca, el análisis de la carne bajo el microscopio muestra lo intrínseco de su relación. La grasa se acumula en los organismos bajo la piel, pero existen determinadas especies animales y razas en las que la grasa tiende a acumularse de forma selectiva dentro del músculo, en concreto en el tejido conectivo intramuscular. Este hecho se conoce como veteado, siendo el ejemplo que nos ocupa, el cerdo ibérico, uno de los más representativos.

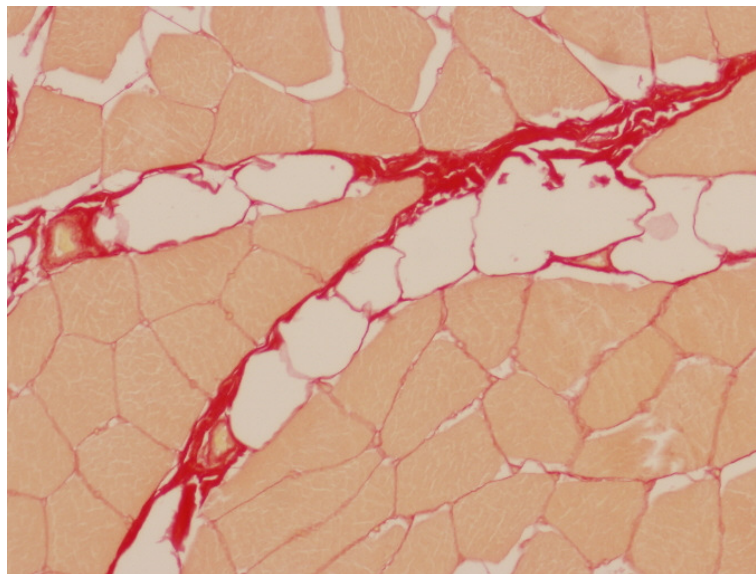


Figura 13. Adipocitos de grasa intramuscular en estrecha relación con el tejido conectivo intramuscular, constituyendo lo que se conoce como veteado. Corte histológico del músculo *masseter* de carne de cerdo ibérico teñida con rojo Sirio y observado con objetivo de 20 aumentos.

Como es bien sabido, la aportación de la grasa a la dureza de la carne es mínima, ya que se trata de un componente con poca resistencia en crudo que pasa a ser casi nula durante el cocinado, ya que se funde o ablanda con el

calor. Y aunque todas las carnes en mayor o menor medida contienen grasa, su proporción está muy vinculada al tipo de animal (no es lo mismo una vaca que un ave), raza (cerdo ibérico frente a cerdo blanco) su edad (buey o ternera) y la dieta de engorde que haya seguido el animal (Fennema, 2000; Niños et al., 2007; Purslow, 2005).

El soporte físico para esta acumulación de grasa lo otorga el tejido conectivo intramuscular, en concreto el perimio, que es la estructura fundamental de empaquetamiento de la grasa dentro del músculo. El veteado de la carne por tanto será la suma del tejido conectivo intramuscular y la grasa intramuscular. La mayor o menor integridad del perimio tras el cocinado dependerá del tratamiento térmico que se le aplique a la carne, aunque su cantidad y grosor, incluso dentro de una misma especie animal, también está determinada por factores genéticos y fisiológicos del animal: raza, edad, tipo de músculo considerado y su desarrollo por el ejercicio (músculos muy desarrollados tendrán perimio más gruesos). De forma general se acepta que un perimio grueso está asociado a mayor dureza en la carne, así como que la mayor diferencia en el tejido conectivo intramuscular de los diferentes animales de una misma raza es debida al volumen del perimio, siendo el epimio y el endomio mucho más constantes. Más adelante se explicará cómo las diferentes técnicas de cocinado afectan a estos componentes de la carne (Fennema, 2000; Purslow, 2005).

1.3. TRANSFORMACIÓN DEL MÚSCULO EN CARNE.

1.3.1. Bioquímica de la contracción muscular.

En condiciones de relajación, el músculo mantiene separadas las dos proteínas principales de la fibra muscular, la actina y la miosina, por un bloqueo que conlleva consumo de energía (ATP) para separar la unión entre actina y miosina (Fennema, 2000). Cuando un estímulo nervioso es recibido por las fibras musculares estriadas se produce un cambio en la diferencia de potencial eléctrico que existe entre el interior y el exterior de la fibra que lleva a la liberación de gran cantidad de iones de calcio en el sarcoplasma celular. Se desencadena pues una cadena de reacciones mediadas por calcio que desbloquean a la actina y a la miosina. Al tener actina y miosina una alta afinidad la una por la otra, se desplazan y se mantienen unidas, provocando la

contracción de la fibra muscular y la formación del complejo actomiosina. Cuando cesa la excitación nerviosa, se produce una absorción de los iones de calcio por parte de las estructuras responsables con nuevo consumo de energía, de forma que las actina se vuelve a bloquear de nuevo y se provoca la ruptura del complejo actomiosina, separándose actina y miosina. Estas dos proteínas tienden de forma natural a estar unidas, de forma que podríamos decir que el estado de equilibrio (el estado de mínima energía) de la fibra muscular es la contracción (Fennema, 2000; Rosenthal, 2001).

1.3.2. Rigor mortis: instauración y resolución.

Durante las primeras 24 horas post mortem se van a producir muchos cambios bioquímicos y estructurales que van a convertir al músculo en carne. Cuando se sacrifica y desangra a un animal, cesa el flujo de sangre por su organismo y la llegada a los músculos de oxígeno y sustancias nutrientes se ve interrumpida. Durante un periodo corto de tiempo el músculo va a conseguir obtener energía en forma de ATP de las reservas de oxígeno presentes en la mioglobina (rutas aeróbicas) y también por las llamadas rutas anaeróbicas (glicólisis), existiendo un descenso rápido en las cantidad de fosfato de creatina y aumentando lentamente los niveles de lactato. Por tanto, durante este primer periodo el músculo se va a mantener relajado, ya que el ATP suministrado va a mantener bloqueada a la actina y va a posibilitar la reabsorción de calcio. Esto se traduce en una separación entre la actina y la miosina, estando la fibra muscular al máximo de su longitud (Fennema, 2000; Rosenthal, 2001; Savell et al., 2005).

En un periodo corto de tiempo, diferente para cada especie animal, la mioglobina agota todo el oxígeno que almacenaba y la vía anaerobia es incapaz de suministrar toda la energía necesaria, ya que ésta es 15 veces menos eficiente que la ruta aeróbica (la del oxígeno y la mioglobina) para conseguir energía. Cuando los niveles de fosfato de creatina son bajos se produce un rápido descenso del ATP. Se produce la pérdida de la capacidad secuestrante de calcio por parte del retículo sarcoplasmático y las mitocondrias debida al deterioro de los sistemas generadores de energía de la célula y a un aumento de la permeabilidad de estos orgánulos celulares. Este aumento de los niveles de calcio en el sarcoplasma sirve para que las proteínas contráctiles

exhiban de modo más completo su potencial ATPasa e inicien la actividad ATPasa en los sistemas de membrana, disminuyendo el pH más rápido (Fennema, 2000). Esta liberación de calcio favorece la formación de los complejos de actomiosina y la contracción masiva de toda la musculatura del animal. Este fenómeno es percibido por el observador como un proceso progresivo de encogimiento o acortamiento muscular conocido como rigor mortis. El término rigor hace referencia al agotamiento del ATP de forma individual por cada fibra muscular. La adición del término *mortis* se refiere al estado de rigidez de los músculos del organismo cuando todas sus fibras han consumido todo el ATP durante las primeras horas tras el sacrificio del animal (Fennema, 2000; Rosenthal, 2001; Tornberg, 1996).

Aunque los mecanismos que subyacen en el rigor mortis son puramente bioquímicos, el control de este proceso tras el sacrificio de los animales es crucial desde el punto de vista de la calidad de la carne. Su ternura puede verse fuertemente influenciada si el manejo de los animales y la conservación de las canales no se realiza adecuadamente, sobre todo en lo referente al binomio tiempo/temperatura de la carne, pues el pH que finalmente se alcance determinará muchas de las características texturales de la carne, así como su color, capacidad de retención de agua y resistencia al desarrollo de microorganismos (Fennema, 2000).

Como resultado del metabolismo en ausencia de oxígeno, los músculos que han sufrido rigor mortis van acumulando ácido láctico como producto final de la reacción. El pH *in vivo* del músculo se sitúa entre 7,3-7,4, un nivel neutro de pH. Pero el aumento de la concentración de ácido en la fibra muscular va a provocar un descenso a niveles de pH más ácidos (pHs menores de 7), alcanzándose valores entre 5,5-6,4 según la especie animal y el tipo de músculo (rojo o blanco, ya que tienen diferentes cantidades de oxígeno almacenado), siendo para cerdo un pH normal entre 5,2 y 5,5, cercanos al punto isoeléctrico de la miosina (Fennema, 2000; Huff-Lonergan & Lonergan, 2005; Tornberg, 1996).

Las miofibrillas son el mayor componente del músculo, constituyendo un 82-87% del volumen total de la célula muscular. Un gran porcentaje del agua que se encuentra en el músculo está unida a las miofibrillas o en su entorno, considerándose que el 85% del agua del músculo está atrapada por las

miofibrillas, principalmente por fuerzas de capilaridad. Al entrar en rigor la actina y la miosina van a mantenerse unidas gracias a la formación de puentes cruzados. A este hecho hay que sumarle que el pH de la carne está cerca del punto isoeléctrico de las proteínas, lo que favorece un encogimiento lateral de las miofibrillas y disminuye de forma muy considerable el espacio disponible para el agua, generándose una salida de líquido desde el fluido sarcoplasmático al espacio extracelular (Huff-Lonergan & Lonergan, 2005).

A modo de resumen, para considerar completada la evolución de músculo a carne se tiene que producir el consumo total de la energía, una evolución de metabolismo aeróbico a anaeróbico favoreciendo la producción de ácido láctico y por tanto una bajada del pH, un aumento de la fuerza iónica causado por la incapacidad de función de los canales de sodio, potasio y calcio dependientes de calcio, y un aumento de la incapacidad de la célula de mantener condiciones de reducción (Huff-Lonergan & Lonergan, 2005).

1.3.3. Maduración de la carne.

El estado de rigor mortis es el de máxima dureza de la carne, ya que todas las fibras están contraídas debido a que no pueden relajarse por falta de energía. Pero esta falta de energía no solo conlleva la imposibilidad de regulación del fenómeno contracción-relajación, sino que provoca una pérdida del control enzimático de las células (Fennema, 2000).

Las enzimas proteolíticas más importantes son las calpaínas y las catepsinas. Las calpaínas están situadas en el interior de las bandas Z de la sarcómero y rompen selectivamente la unión a las mismas de los complejos de actomiosina, sobre todo cuando existe gran cantidad de iones calcio en proximidad. El sistema de calpaínas está compuesto por diferentes isoformas de cisteínproteasas calcio-dependientes y su inhibidor competitivo específico, las calpastatinas. Las calpaínas degradan la estructura miofibrilar y las proteínas del citoesqueleto que degradan el músculo para convertirlo en carne (Geeseink & Koohmaraie, 1999; Huff-Lonergan et al., 1996). Conforme avanza el periodo post mortem, determinados cambios en el microambiente celular (bajada del pH, incremento de la fuerza iónica, etc.) la actividad de las calpaínas se ve modificada, ya que estas enzimas tienen menor tasa de actividad frente a las proteínas miofibrilares a valores de pH y fuerza iónica cercanos a los

encontrados en el músculo post-mortem. Las calpaínas también atacan al citoesqueleto, en concreto a la desmina, talina y vinculina de los filamentos intermedios. La degradación de las proteínas de los filamentos intermedios precozmente en estados post mortem puede minimizar el flujo de agua afuera de la célula (Huff-Lonergan & Lonergan, 2005).

Las catepsinas son proteasas específicamente destinadas a degradar las moléculas de colágeno del tejido conectivo, aunque por estar situadas dentro de las fibras musculares actúan solo tardíamente y afectan principalmente al endomisio próximo, que además ofrece menos resistencia por no tener enlaces cruzados entre sus fibras de colágeno. Un dato interesante es que la resolución del rigor mortis rompe la sarcómero longitudinalmente pero prácticamente no afecta a las miofibrillas en sentido transversal, por lo que la retracción sagital de la fibra muscular ya no se recupera nunca, un dato que puede ser percibido y analizado mediante el microscopio.

Como resultado se va a producir un ataque descontrolado de estas enzimas sobre los puntos de anclaje del complejo de actomiosina, rompiendo la unión y distendiendo la musculatura. De esta forma el rigor mortis se va a ir “resolviendo” hacia un estado de mayor relajación muscular por este ataque enzimático sobre las proteínas musculares. Es interesante reseñar que las mejores condiciones para la activación de los sistemas enzimáticos exigen temperaturas de conservación de la carne entre 10 y 17° C hasta la resolución de rigor mortis, consiguiéndose un menor acortamiento del músculo y máximo potencial de envejecimiento. Pero esta práctica está muy poco extendida e incluso prohibida en determinados sectores por el riesgo microbiológico al que se expone la canal a dichas temperaturas (Fennema, 2000).

Resolución del rigor mortis se entiende como pérdida de la dureza de la carne, aunque este proceso de autodigestión enzimática continúa de forma generalizada sobre la canal. Hablamos ya de maduración de la carne, considerándose como la evolución hasta el punto óptima de la misma para el consumo en cámaras frigoríficas a 4°C. Las enzimas van a continuar actuando sobre las proteínas de la carne, rompiéndolas y provocando la desorganización de estructuras. La mayor parte de los complejos de actomiosina se van a degenerar durante esa resolución del rigor mortis, pero la completa maduración conlleva además una degeneración enzimática del tejido conectivo

intramuscular, es decir, del colágeno. Durante el almacenamiento post-mortem de la carne hay una proteólisis significativa tanto del colágeno como de la matriz de proteoglicanos constituyentes del tejido conectivo intramuscular, lo que aumenta la cantidad de colágeno que puede ser solubilizado en la carne y reduce la dureza de la carne fresca (Lewis et al., 1991; Stanton et al., 1987).

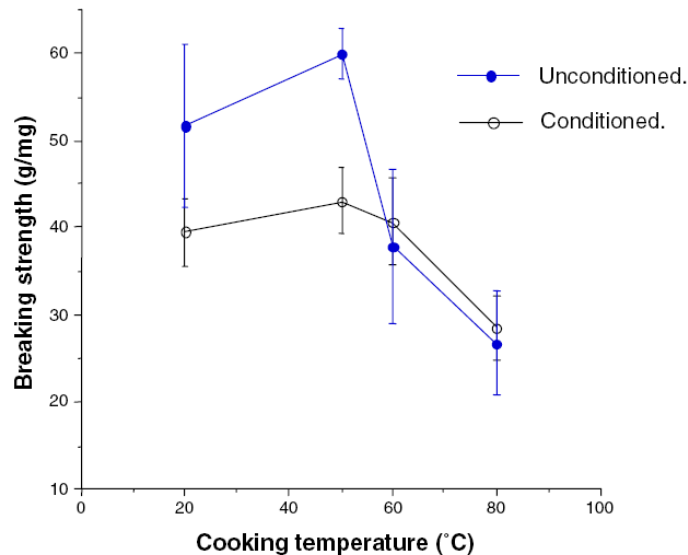


Figura 14. Fuerza del perimio aislada de carne tras cocinarla a las temperaturas indicadas. Comparación de perimio muscular con un día de evolución post mortem (no madurado) y músculo almacenado durante 14 días (madurado). Tomada de Purslow (2005).

El mayor o menor tiempo durante el cual ocurre la maduración de las carnes en las distintas especies se relaciona con la cantidad de enlaces cruzados maduros que existan en el colágeno del tejido conectivo intramuscular, que en el caso del vacuno alcanzan su mayor importancia, siendo muy poco relevante en carne de cerdo (Purslow, 2005).

Todo este proceso general (resolución del rigor mortis más maduración de la carne) es muy rápido e intenso en las fibras musculares blancas (contracción rápida) que en las fibras musculares rojas (de contracción lenta). Este hecho explica por qué el control de la temperatura y el tiempo de las canales son de vital importancia en el ganado vacuno, en el cual predominan las fibras rojas. Esto conlleva una resolución y maduración más lenta que en cerdo, en donde su mayor porcentaje de fibras blancas hace que se produzca el ablandamiento en mucho menos tiempo. De forma orientativa el tiempo mínimo de resolución

más maduración para carne de pollo es de 2 días, 3-6 días para cerdo y máximo para vacuno, de 10-21 días dependiendo de la raza y edad del animal.

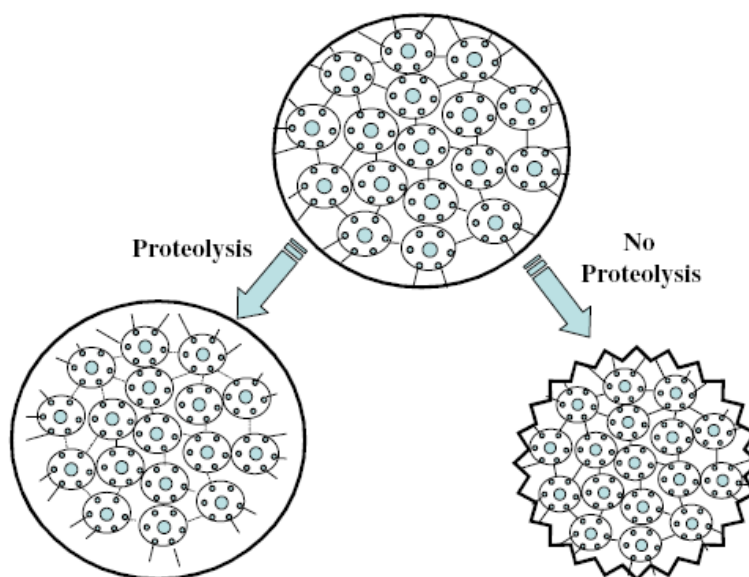


Figura 15. Visión esquemática de los cambios potenciales en diámetro de las células musculares durante el envejecimiento post mortem influenciado por la proteólisis. Tomada de Huff-Lonergan & Lonergan (2005).

Este proceso de maduración debe realizarse en cámara frigorífica entre 0-4^o C de temperatura durante un número variable de días dependiendo de la especie animal considerada. Si se lleva a cabo una refrigeración precipitada de la carne antes de la resolución del rigor mortis, con temperaturas inferiores a 10^o C en las 10 primeras horas tras el sacrificio, el pH de la carne aún se encontrará por encima de 6 y la carne sufrirá un acortamiento permanente por frío (*cold shortening*). Este fenómeno, de especial relevancia en carne de vacuno, impide la correcta maduración de la carne que quedará muy dura al consumirla. La estimulación eléctrica de las canales tiene un efecto preventivo ante este fenómeno, como ya se ha descrito. De cualquier modo, en los procesos de maduración post-mortem de la carne solo se degrada entre el 1 y el 5% del colágeno del animal, siendo el tratamiento térmico el principal factor determinante de los cambios en el tejido conectivo intramuscular (Purslow, 2005).

1.4. PARÁMETROS DE CALIDAD DE LA CARNE.

1.4.1. pH.

Es la característica de calidad de la carne más importante, ya que afecta directamente a la estabilidad y propiedades de las proteínas, y de su valor final, medido generalmente a las 24 horas post-mortem, dependerán prácticamente todos los atributos importantes de calidad de la carne, como son la capacidad de retención de agua y el color. Como ya se ha comentado, tras el sacrificio se pierde el aporte de oxígeno y nutrientes, intentando mantener la integridad disipando toda la energía de la célula por vía anaeróbica y provocando un descenso pronunciado del pH (Ramírez, 2004).

Un hecho interesante es que el estrés derivado del transporte y manejo del animal antes del sacrificio, sobre todo en el ganado porcino, puede tener consecuencias sobre la calidad de la carne y sobre todo en su capacidad de retención de agua. Un periodo de estrés corto y agudo produce un aumento de la concentración plasmática de adrenalina y derivados y un excesivo gasto energético, agotándose las reservas de glucógeno muscular. Ambas condiciones estimulan el metabolismo anaeróbico del músculo y la formación de ácido láctico antes del desangrado. Esto conlleva una disminución del pH intramuscular a valores más ácidos, pudiendo situarse por debajo de 6 ya durante la primera hora post-mortem. Hay una disminución de la repulsión electrostática entre los miofilamentos cuando la temperatura de la canal es todavía muy elevada (>38°C). Esto conduce a una intensa desnaturalización de las proteínas contráctiles y sarcoplasmáticas. Si las proteínas sarcoplasmáticas se desnaturalizan, se pueden adsorber a las proteínas contráctiles, modificando así las propiedades físicas de las mismas. Este descenso excesivamente rápido del pH se relaciona con el músculo pálido-blando-exudativo (carnes PSE, del inglés *pale, soft and exudative*), mayoritariamente en músculos compuestos por fibras blancas glicolíticas de contracción rápida, muy abundantes en el cerdo. Por el contrario, cuando el estrés se prolonga durante muchas horas haciéndose crónico y con una intensidad sostenida no se produce la necesaria acidificación del pH a partir del ácido láctico, imprescindible para la activación enzimática que lleva a la resolución del rigor mortis. En este caso la carne presenta un aspecto oscuro, seco y firme (carnes DFD, del inglés *dry, firm and dark*), afectando negativamente a su apariencia.

Asimismo se favorece el crecimiento bacteriano, sobre todo si las condiciones de conservación no son las adecuadas. Este defecto se conoce como carne DFD, siendo más frecuente su aparición en los músculos oxidativos o de contracción lenta (Fennema, 2000; Terlouw, 2005).

1.4.2. Color.

El color de los músculos es debido a un pigmento llamado mioglobina, muy similar a la hemoglobina presente en los glóbulos rojos de la sangre y con la misma función: almacenar oxígeno, en este caso en el interior de las células. Cuanto mayor sea la cantidad de mioglobina presente en el músculo, mayor será la coloración roja del mismo y de una forma mucho menos técnica se procederá a clasificar a los músculos como rojos, blancos o intermedios. Esta clasificación es en realidad una clasificación funcional y fisiológica, ya que el color del músculo dependerá de la cantidad de mioglobina, y a su vez ésta va a venir determinada por los requerimientos de oxígeno del mismo, siempre relacionado con el tipo de actividad que va a desempeñar ese músculo (Fennema, 2000).

1.4.2.1. Mioglobina.

Las decisiones a la hora de llevar a cabo una compra de carne se ven influenciadas prácticamente en su totalidad por el color de la misma. La mioglobina es la principal proteína responsable del color de la carne, aunque otras proteínas hémicas como la hemoglobina y los citocromos C pueden un papel importante. La mioglobina es una proteína soluble en agua que contiene 8 α -hélices unidas por secciones cortas no-hélice. De los numerosos residuos de la cadena de mioglobina, la histidina recibe la mayor atención, porque juega un doble papel estructural y funcional dentro de la molécula. La mioglobina también contiene un grupo prostético localizado dentro de la parte hidrofóbica de la proteína. El anillo hémico tiene localizado en su centro un átomo de hierro que puede formar seis puentes de unión. Cuatro de estos puentes son con átomos de nitrógeno pirrólico mientras que la 5ª valencia de coordinación se une a la cercana histidina-93. El 6º sitio de unión queda libre para la unión reversible de ligandos. La distal histidina-64 también influye en la dinámica

del color, afectando a las relaciones espaciales dentro del grupo hemo hidrofóbico (Fennema, 2000; Mancini et al., 2005).

La función principal de la mioglobina es almacenar oxígeno en el músculo, que queda unido a esta 6ª valencia de coordinación. Pero existen otros átomos que se pueden unir a ella, provocando diferentes coloraciones en la carne y formando 4 posibles tipos de mioglobina, interconvertibles entre sí. Si la 6ª valencia de coordinación se encuentra vacía y el átomo de hierro del grupo hemo está en forma ferrosa (Fe^{2+}) se forma un tipo especial de mioglobina, la deoximioglobina, que otorga a la carne un color entre rosa y morado. Esta coloración está presente en carnes envasadas al vacío o inmediatamente tras el corte de piezas cárnicas frescas. Son necesarias tensiones muy bajas de oxígeno para mantener la mioglobina en estado de deoximioglobina. La oxigenación ocurre cuando la mioglobina se expone al oxígeno y se caracteriza por un desarrollo de color brillante rojo cereza. No ocurren cambios en la valencia del hierro durante la oxigenación, aunque el sitio de la 6ª valencia de coordinación está ahora ocupado por oxígeno diatómico. Además, la histidina distal interacciona con el puente de oxígeno, alterando la estructura y estabilidad de la mioglobina. Conforme aumenta la exposición al oxígeno, la oximioglobina penetra a capas más profundas de la carne a través de la superficie. La profundidad de penetración del oxígeno y la densidad de la capa de oximioglobina dependen de la temperatura de la carne, presión parcial de oxígeno, pH y competición por el oxígeno por otros procesos respiratorios (Mancini et al., 2005).

La decoloración de la carne es resultado de la oxidación tanto del derivado férrico de la mioglobina como del hierro férrico. Aunque la decoloración está normalmente asociada a la cantidad de área superficial cubierta por metamioglobina, la mioglobina subsuperficial un papel importante en la apariencia del producto. Esto es debido a que la metamioglobina debajo de la superficie (localizada entre la oximioglobina superficial y la deoximioglobina interior) se va espesando gradualmente y se mueve a través de la superficie. La formación de la metamioglobina depende de numerosos factores, como son la presión parcial de oxígeno, temperatura, pH, actividad reductora de la carne y, en algunos casos, el crecimiento microbiano (Mancini et al., 2005).

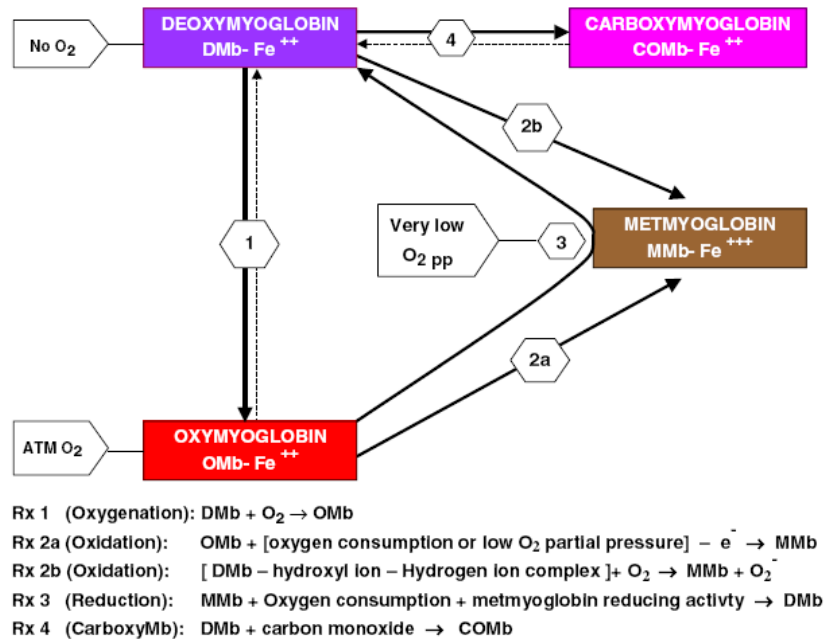


Figura 16. Interconversiones redox de la mioglobina en la superficie de la carne. Tomado de Mancini & Hunt (2005).

La reducción de la metamioglobina es crucial en el color de la carne y dependen enormemente de la oxidación del músculo mediada por enzimas, sistemas de enzimas reducidos y NADH, limitado en el músculo post mortem. Desgraciadamente, tanto la actividad enzimática como el NADH están continuamente consumiéndose conforme avanza el tiempo desde el sacrificio. La reducción de la oximioglobina en la superficie de la carne fresca es una reacción en dos pasos. Como resultado, la oximioglobina no se convierte directamente en deoximioglobina, pero primero procede a través del estado férrico reducido a baja presión parcial de oxígeno. La eliminación endógena de oxígeno para conseguir bajas presiones parciales de oxígeno se lleva a cabo por consumo del oxígeno, lo que probablemente resulta en oxidación de oximioglobina a metamioglobina. Desde un punto de vista práctico, esto es normalmente problemático porque la formación de deoximioglobina subsecuente depende pues de la capacidad reductora del oxígeno más la reducción de la tensión del oxígeno (Mancini et al., 2005). Por ejemplo, la reducción química de la oximioglobina supone un problema cuando empaquetamos productos a vacío en atmósferas de oxígeno ultra-bajas, ya que

la química de la carne no es capaz de fomentar el consumo de oxígeno asociado con la reducción de hierro férrico a ferroso.

La carboximioglobina es un estado químico relevante de la mioglobina debido al actual aumento del interés del empaquetamiento con bajos niveles de monóxido de carbono. No se conoce con exactitud cómo los derivados de la mioglobina pueden formar carboximioglobina. Obviamente, el monóxido de carbono puede unirse a la 6ª valencia de coordinación vacía de la deoximioglobina y atorgar un fuerte color rojo brillante que es relativamente estable. Muchos conceptos fundamentales de la química de la carboximioglobina permanecen sin respuesta, independientemente de la importancia en el color de la carne, como si puede el monóxido de carbono desplazar al oxígeno de la 6ª valencia de coordinación, o bien, mientras que la metamioglobina es fisiológicamente inerte, si puede el monóxido de carbono promover la reducción y formación de un color rojo brillante desde carnes oxidadas. Parece ser que la deoximioglobina es más fácilmente convertible a carboximioglobina que la oximioglobina y la metamioglobina. No obstante, el monóxido de carbono podría disociarse lentamente de la mioglobina después de que la carboximioglobina es expuesta a atmósferas libres de monóxido de carbono (Mancini et al., 2005).

1.4.3. Capacidad de retención de agua.

Además del color y el pH, otro atributo primario de calidad de las carnes es su capacidad de retención de agua, pues no debe olvidarse que la jugosidad residual del producto, además de ser esencial para vehicular el sabor, contribuye de forma muy importante a su mejor deglución.

La capacidad de retención de agua es la capacidad para retener la humedad propia del alimento cuando se somete a factores externos, tales como corte, presión y temperatura. Cuando se aplican cualquiera de las condiciones anteriores, la carne sufre pérdidas de humedad debido principalmente al agua libre de su estructura. La capacidad de retención de agua es una propiedad de gran importancia en la calidad de la carne, ya que sufre cambios antes, durante y después de la cocción. Durante el cocinado se va a producir una contracción de las proteínas tanto del tejido conectivo como de la fibra muscular, generando una fuerte retracción del tejido y por tanto obligando al agua a salir

fuera de la carne. Todo ello va a suponer pérdidas de humedad en la carne que afectarán directamente a su textura (Huff-Lonergan & Lonergan, 2005; Tornberg, 2005).

El músculo magro contiene aproximadamente un 75% de agua, de la cual la mayor parte de la cual está atrapada dentro del músculo y de la fibra muscular, especialmente en relación a las miofibrillas. El agua es una molécula bipolar y es atraída por moléculas cargadas, como por ejemplo las proteínas. De hecho, parte del agua de las fibras musculares está unida a proteínas (Huff-Lonergan & Lonergan, 2005). Después del sacrificio, la capacidad de retención de agua se ve afectada por factores como la caída del pH, la pérdida de ATP, la instauración del rigor mortis y los cambios en la estructura miofibrilar, asociados en parte a la actividad proteolítica (Koochmaraie, 1994; Ouali, 1990). En los cambios post-mortem que experimenta la carne, las diversas membranas de las células pierden su capacidad de retención osmótica al cesar el aporte de energía, tendiendo el agua a fluir hacia los espacios extracelulares, fenómeno además favorecido porque al disminuir el pH las proteínas tienden a perder sus cargas eléctricas moleculares, responsables de mantener la atracción sobre las moléculas de agua. Los espacios extracelulares se rellenan de agua poco ligada al tejido, que podrá perderse con facilidad mediante goteo o evaporación (Tornberg, 2005).

Por ello, las propiedades físicas más importantes de la carne (color, firmeza, jugosidad y textura) están estrechamente relacionadas con la capacidad de retención de agua. Cuando los tejidos tienen poca capacidad de retener agua durante el almacenamiento, las pérdidas por goteo pueden ser grandes y al mismo tiempo se pierden algunas proteínas solubles, vitaminas y minerales. Va a ser importante desde el punto de vista del consumidor, ya que cambios en la capacidad de retención de agua de la carne van a provocar exudados desagradables de la carne, pérdida de nutrientes en dicho exudado y un aumento de la rigidez de esa carne por pérdida de humedad (Tornberg, 2005).

Como ya se ha mencionado, el agua es el mayor constituyente de la carne magra (70-75% de promedio) seguido por las proteínas (19-21%). Cerca del 80% del agua intramuscular se encuentra en forma de agua atrapada, es decir, localizada en cavidades y espacios entre tejidos. Las fibras musculares ocupan alrededor del 70% del volumen en músculos magros, estando por tanto la

mayor parte del agua retenida en este componente. Por tanto cualquier dilatación o retracción de las mismas va a afectar directamente a la capacidad de retención de agua (Tornberg, 2005).

Hay otros muchos procesos en donde se va a ver afectado la capacidad de retención del agua, como pueden ser la refrigeración, congelación, secado, salado, marinado, manufacturado y almacenaje (Tornberg, 2005).

1.4.4. Análisis de las propiedades texturales: Test de Warner-Bratzler.

Las propiedades relacionadas con la textura son las características de calidad más apreciadas por el consumidor y se caracterizan por ser difíciles de definir ya que, al igual que el color, las propiedades de textura de una misma muestra pueden tener diferente significado para el consumidor (Ramírez, 2004).

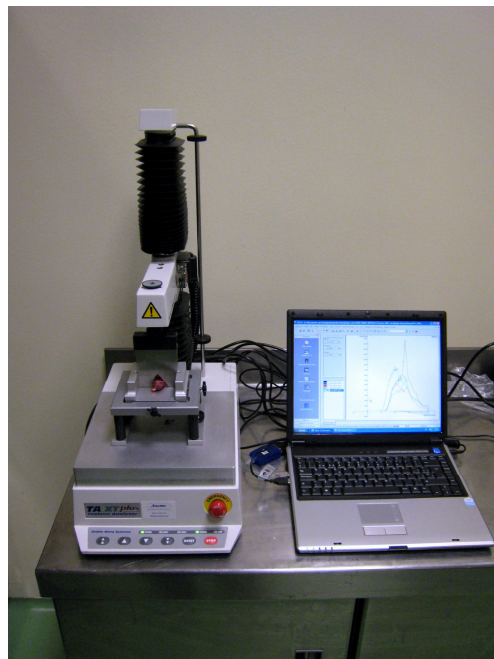


Figura 17. Sistema de análisis de textura.

El test de evaluación de la textura de la carne más extendido es test de Warner-Bratzler, llevado a cabo por el texturómetro, que es un instrumento para la cuantificación de la resistencia a la deformación o corte de una muestra al aplicar una fuerza dada. Se trata de una prueba empírica utilizada ampliamente para medir la ternura de diferentes alimentos, entre ellos la carne. En este ensayo intervienen fuerzas de tensión, corte y compresión (Bourne,

1982). Diversos autores afirman que el test de Warner-Bratzler ofrece información sobre los dos principales componentes estructurales de la carne que contribuyen a la dureza de la misma: fibras musculares y tejido conectivo intramuscular (Honikel, 1997; Møller, 1980; Poste et al., 1993; Rosenthal, 2001).

1.5. EFECTOS DEL CALOR SOBRE LA CARNE.

Las proteínas de la carne, que representan aproximadamente el 20% del peso muscular, son el mayor constituyente de la misma y son responsables de la estructura de los productos cárnicos. Estas proteínas experimentan cambios estructurales importantes con el calor y por tanto afectan a la calidad del producto final, que está condicionado por la estructura de la carne y por tanto se ve afectado drásticamente por el cocinado (Tornberg, 2005).

La dureza de la carne incrementa con la temperatura del tratamiento térmico. De forma general se produce un marcado aumento de la dureza de la carne entre 40°C y 50°C, seguido de una disminución o estabilización de este fenómeno de aumento de dureza entre 50°C y 60°C, dependiendo del tipo de tratamiento térmico utilizado. En torno a 65°C vuelve a presentarse un aumento de la dureza de la carne (Purslow, 2005). La explicación a estos hechos la encontramos en la desnaturalización de las diferentes proteínas que constituyen la carne.

1.5.1. La desnaturalización proteica.

Las proteínas se encuentran de forma general plegadas sobre sí mismas y en algunas ocasiones en asociación con otras cadenas de la misma proteína, formando estructuras complejas. Los cambios conformacionales de las proteínas que ocurren durante el calentamiento son conocidos como desnaturalización (Tornberg, 2005), generándose una desestabilización y ruptura de los enlaces que mantienen el plegamiento y perdiéndose así la estructura nativa (Fennema, 2000).

Los agentes desnaturalizantes pueden ser de naturaleza química o física, entre los que podemos destacar presión, fuerzas mecánicas, pH o temperatura. Desde un punto de vista gastronómico y tecnológico, el de mayor importancia va a ser la temperatura, ya que el calor es el agente de mayor relevancia para

la conservación y cocinado de los alimentos. Al calentarse la proteína por encima de la temperatura de fusión o desnaturalización se desestabilizan sus enlaces y se produce la desnaturalización de la misma. Esto conlleva un aumento de la digestibilidad de la proteína, pero puede ocasionar diversos problemas tecnológicos, derivados de la pérdida de muchas de las propiedades funcionales de la proteína (Tornberg, 2005).

El proceso de desnaturalización va a provocar importantes cambios morfológicos en la carne, como pueden ser la destrucción de las membranas celulares, la retracción longitudinal y transversal de las fibras, agregación y gelificación de las proteínas sarcoplasmáticas y encogimiento y solubilización de las proteínas del tejido conectivo.

1.5.1.1. La desnaturalización proteica por el calor.

La fibra muscular puede sufrir tanto retracción transversal como longitudinal. La retracción transversal ocurre a partir de los 40° C y es máxima a los 80° C. Consiste en la aparición de un espacio entre las fibras y el endomisio que se ensancha de forma progresiva conforme sube la temperatura, oscilando el mínimo perceptible entre el 3% a 40°C, indistinguible de la retracción residual del rigor mortis, y el 14% a 80° C (Purslow, 2005; Tornberg, 2005).

El colágeno contribuye de forma notable en la primera fase de endurecimiento de la carne a 40-60°C cuando el tratamiento térmico se lleva a cabo a baja temperatura, y disminuye por encima de 60°C (Bouton et al., 1981). Lewis et al. (1989) muestran que el perimio de carne de vacuno cocinada aumenta su dureza hasta en carne cocinada hasta 50°C y disminuye por encima de esa temperatura. En el caso de carne de cerdo, la fuerza de las fibras musculares continúa aumentando por encima de los 90°C (Mutungi et al., 1996). Diversos autores han confirmado que el cocinado aumenta la contribución del tejido conectivo intramuscular a la dureza de la carne en el rango de 20 a 50°C de temperatura, siendo más evidente la contribución miofibrilar a partir de 60°C. El acortamiento de la fibra de colágeno por encima de los 60°C hace que se produzca un acortamiento del tamaño de la pieza de carne entre 65 y 80°C, debido al propio encogimiento del colágeno y debido al menor volumen de la fibra muscular, se genera una mayor dureza en la carne, incrementándose con

la temperatura y pudiendo oscilar entre el 7 y el 19% (Christensen et al., 2000; Bouton et al., 1981; Lepetit et al., 2000).

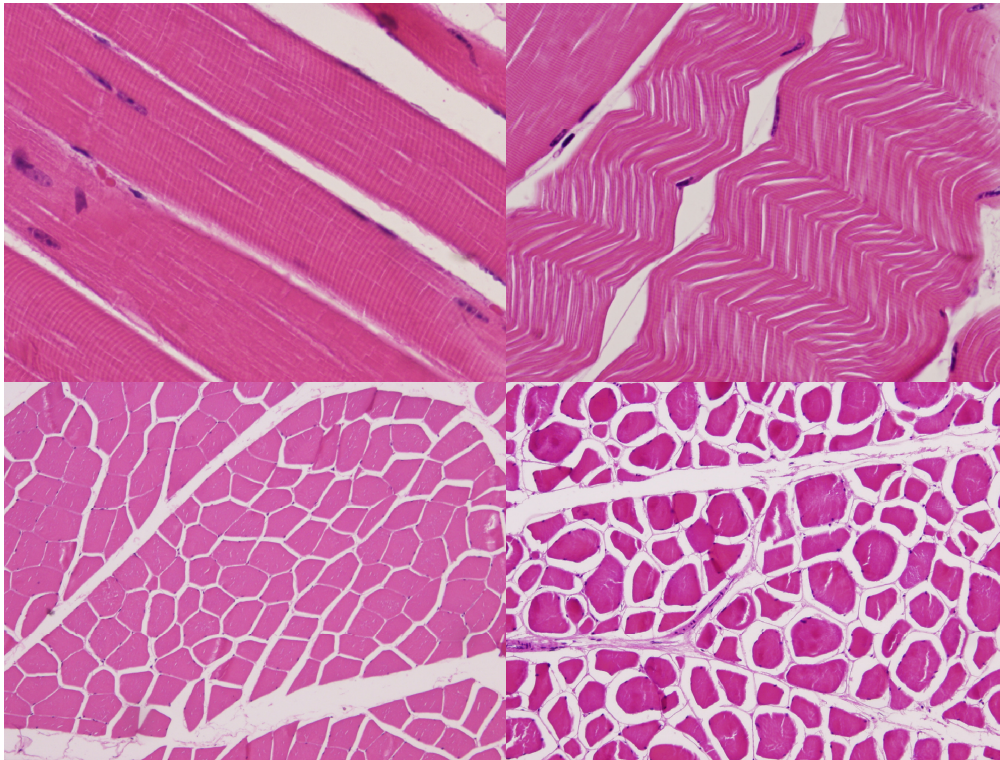


Figura 18. De arriba a abajo y de izquierda a derecha: fibras musculares de carne de cerdo ibérico cruda (40x), contracción de las miofibrillas por efecto del calor en carne de cerdo ibérico cocinada (40x), turgencia de las fibras musculares en carne de vacuno madurada (20x), retracción de las fibras musculares en carne de vacuno cocinada (20x). Tinción de hematoxilina-eosina.

Tornberg (2005) revisa los efectos del calor sobre las proteínas y las técnicas de calorimetría diferencial indican que entre 53 y 63°C se produce la desnaturalización del colágeno, existiendo primero una rotura de los puentes de hidrógeno y posteriormente una contracción de la molécula de colágeno. Otros procesos, como por ejemplo la desnaturalización proteica de las proteínas del citoesqueleto, muy probablemente jueguen un papel importante en el aumento de la dureza de la carne con la temperatura (Purslow, 2005). En esta línea es interesante comentar el efecto reblandecedor debido a la inactivación de las enzimas por el calor, debido a la clara desnaturalización de las mismas. Las colagenasas pueden permanecer activas por debajo de 60°C,

mientras que tras un rápido calentamiento a temperaturas de entre 70 y 80°C esta enzima queda inactivada (Tornberg, 2005).

Pero este proceso de contracción longitudinal ya comentado entre 60-70°C y mediado por la contracción de la red de fibras del tejido conectivo intramuscular es el responsable de la mayor pérdida de agua por parte de la carne durante su cocinado, y cuando no se continúa calentando por encima de 60°C, al cortar la pieza de carne, es posible una desagradable disociación entre la carne y sus jugos, con presencia de gotas de agua (Fennema, 2000; Tornberg, 2005).

1.5.2. La transformación de colágeno en gelatina.

El calor afecta al tejido conectivo intramuscular provocando una ruptura de la cadena lineal de colágeno de forma progresiva, transformándose en una mezcla de 18 aminoácidos agrupados en cadenas polipeptídicas de longitud variable, solubles en agua y que poseen una elevada capacidad adhesiva. A esta sustancia, que habitualmente pasa en grandes cantidades al líquido de hervido si este es el procedimiento empleado para cocinar la carne, se le llama gelatina (del latín *gelatus*: helado) por su espectacular cambio de estado líquido-gelatinoso a sólido cuando la temperatura del caldo desciende por debajo de 37° C.

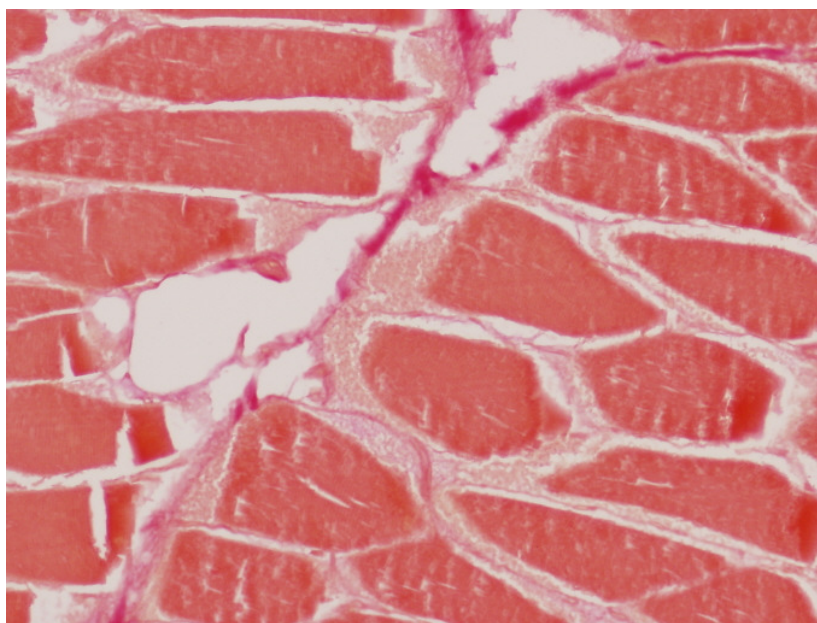


Figura 19. Corte histológico del músculo *masseter* de cerdo ibérico cocinado durante 2 horas y 45 minutos a 94°C. Se puede observar la completa gelatinización del colágeno endomisial.

Tinción rojo Sirio observada con objetivo de 20 aumentos.

Este fenómeno es conocido como plegamiento del colágeno, y consiste en la renaturalización parcial de sus moléculas de forma que se llega a formar un gel sólido a bajas temperaturas (Purslow, 2005; Tornberg, 2005).

La temperatura media a la que se produce este fenómeno se conoce como temperatura de fusión del colágeno, que en la carne de mamíferos oscila entre 65 y 75°C. Aunque el encogimiento del colágeno comienza a los 64°C, soliendo ser completa la desnaturalización a 70°C, aunque a veces hace falta alcanzar valores de 80-85°C, debido a la mayor cantidad de enlaces cruzados entre fibras de colágeno, que al ser termorresistentes impiden este proceso (Tornberg, 2005).

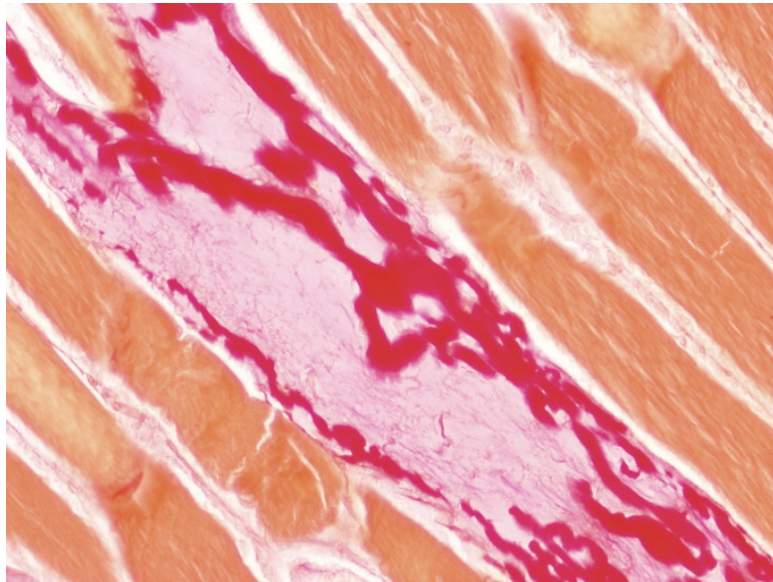


Figura 20. Corte histológico del músculo *masseter* de cerdo ibérico cocinado durante 2 horas y 45 minutos a 94°C. Perimio en fase de gelatinización del colágeno. Tinción rojo Sirio observada con objetivo de 20 aumentos.

En *M. semitendinosus* cocinado a 80°C, Lewis et al. (1991) observan que en los primeros estados del tratamiento térmico, los fascículos musculares aparecen separados unos de otros por la ruptura de la unión endomisio-perimio, permaneciendo el perimio intacto y visible en las uniones entre fascículos. En estados posteriores de ruptura del tejido conectivo intramuscular, las capas perimisiales tienden a romperse hasta quedar los fascículos

completamente separados e independientes. Este proceso facilita la masticación de la carne, ya que la dureza debida mayoritariamente al perimio del tejido conectivo intramuscular se ve atenuada por su degeneración (Lillford, 2000). El colágeno deja de estar presente, ya que el calor lo ha transformado en gelatina que, al ser soluble, ha pasado o bien a la superficie desde donde se aplica el tratamiento térmico, o bien al agua de cocinado.

1.5.3. La reacción de Maillard.

De forma muy resumida, la reacción de Maillard consiste en la formación en la carne cocinada de compuestos no naturales, en su mayoría aminas volátiles o solubles en agua, por la reacción que ocurre entre las proteínas o sus aminoácidos y los azúcares reductores o las grasas presentes en el alimento, siempre mediados por la acción del calor (O'Brien et al., 1998).

Esta reacción es conocida como pardeamiento no enzimático y origina una particular textura crujiente. Se da siempre que se calientan azúcares reductores y proteínas y depende fundamentalmente de la temperatura (ocurre de forma acelerada comúnmente por encima de los 130° C), por lo que únicamente se observa en la superficie de la carne, ya que en el interior, muy rico en agua, solo pueden alcanzarse los 100° C. En la reacción se producen melanoidinas, derivados pardos insolubles responsables del intenso color pardo dorado que adquiere la superficie de la carne. En la superficie de la carne la mioglobina estará completamente degenerada por los efectos de las altas temperaturas, superiores a 130°C, siendo las responsables del color superficial de la carne cocinada las melanoidinas procedentes de la reacción de Maillard. El color del interior de la carne vendrá determinado por las diferentes formas de mioglobina que aún se mantienen, por haberse alcanzado temperaturas menores (Fennema, 2000; O'Brien et al., 1998).

1.5.4. Pérdidas de agua por cocinado.

Usando métodos físicos para la evaluación de la dureza de la carne se ponen de manifiesto determinados aumentos de la misma en rangos de temperatura determinados. A 40-50°C existe un primer aumento de la dureza debido a la coagulación de las proteínas de la fibra muscular. Este encogimiento de la fibra muscular va a provocar una salida de agua al espacio intercelular, pero esta

agua no se perderá del tejido, sino que queda atrapada entre la fibra muscular y el endomisio. Al seguir aumentando la temperatura hay un nuevo rango de temperaturas entre 60 y 70°C en donde se produce un segundo aumento de la dureza de la carne. Ello es debido a la contracción de las fibras de colágeno del endomisio y perimisio y será de mayor o menor magnitud dependiendo de la cantidad de enlaces cruzados que presente el colágeno. En animales más viejos habrá mayor cantidad de enlaces cruzados y por tanto la tensión a la que se verá sometido dicho tejido será mayor (Fennema, 2000; Tornberg, 2005).

Estos cambios sí van a suponer una pérdida de agua, ya que se provoca la expulsión del agua desde el espacio endomisial al exterior. Esta pérdida de agua, junto con la retracción de las proteínas, va a suponer un aumento de la dureza de la carne. A mayores temperaturas el colágeno del tejido conectivo va a transformarse en gelatina, existiendo una disminución progresiva de la dureza de la carne porque, como anteriormente se ha mencionado, el tejido conectivo intramuscular es uno de los principales determinantes de la textura de las carnes. Estos rangos de temperaturas se van a ver influenciados por otros factores, por lo que lo ideal es siempre hablar del binomio tiempo-temperatura, que va a ser el que realmente nos dé una idea de la intensidad del tratamiento térmico (Fennema, 2000; Tornberg, 2005).

1.5.5. Cambios del color de la carne provocados por el calor.

El calor es el principal agente que afecta a la mioglobina, originando cambios drásticos que generalmente otorgan a la carne un color pardo. En torno a los 65-70° C la mioglobina pierde su capacidad para retener el oxígeno, por lo que la carne se torna rosada. Pero en las últimas décadas el aumento del uso de empaquetamiento bajo atmósferas modificadas ha ocasionado numerosos cambios en el color de la carne debidos al efecto de la atmósfera modificada de empaquetamiento sobre la química redox de la mioglobina (Mancini et al., 2005). Tørrngren (2003) y Seyfert et al. (2004) han estudiado el empaquetamiento de carne de vacuno bajo atmósferas modificadas con alto contenido en oxígeno, concluyendo que este tipo de envasado favorece la transición hacia colores pardos de forma prematura y a bajas temperaturas de cocinado, incluso a 70°C, temperaturas demasiado bajas para la destrucción de patógenos. Esto es debido a que los altos niveles de oxígeno en el envase

maximizan la formación de oximioglobina en la superficie y, en algunos casos, en capas subsuperficiales. Estamos ante el gran dilema de conseguir una carne con un vivo color rojo envasada con atmósferas modificada frente al fuerte pardeamiento de la carne cocinada a temperaturas muy bajas debido a que la oximioglobina y la metamioglobina son menos termoestables que la deoximioglobina y la carboximioglobina (Hunt et al., 1999; John et al., 2004). Algunas industrias comienzan a envasar en atmósferas en CO, más afín por la mioglobina que el CO², junto con bajos contenidos en oxígeno para favorecer el color rosado de la carne en fresco y evitar a la vez el pardeamiento prematuro de la carne tras el cocinado (John et al., 2004).

Otros factores que afectan a la mioglobina y por tanto a la coloración de la carne son el pH, temperatura de almacenamiento, tiempo de almacenamiento, peroxidación lipídica, luz, disponibilidad de nucleótidos, dietas del animal y ejercicio del mismo, presencia de oxígeno y otros iones (Bekhit & Faustman, 2005). En concreto, se ha demostrado que pHs altos protegen a la mioglobina de la desnaturalización térmica, manteniéndose el color rojo-rosado. Esta misma carne tras ser cocinada también se mantiene con colores más cercanos al rojo o rosado, buscados en el interior de carnes poco hechas (Hunt et al., 1999, Lien et al., 2002).

1.6. CONGELACIÓN DE LA CARNE.

Los procesos de congelación de las carnes provocan el deterioro gradual de su calidad gastronómica debido al daño estructural que causa la formación de cristales de hielo, cuyo tamaño está relacionado con la velocidad del proceso de congelación. Estos cambios se traducen en ruptura celular y fibrilar, aumento de las pérdidas de agua tras la descongelación y su cocinado, descenso en la extracción de proteínas, aumento de la ranciedad, alteración del color y variación de la ternura (Savell et al., 2005).

Si se estudia al microscopio el proceso de congelación, los hechos que se producen son fácilmente comprensibles. Los alimentos al comenzar a congelarse sufren un primer proceso de nucleación, consistente en la formación de núcleos de cristalización que por adhesión de nuevas moléculas de agua formarán los cristales de hielo. Este proceso de nucleación está directamente relacionado con la temperatura de congelación. A temperaturas

muy bajas (-80°C) se forman muchos centros de nucleación, mientras que a temperaturas superiores (-20°C) el número de núcleos es mucho menor. Por consiguiente, en la fase de crecimiento de los cristales la competencia entre ellos para agregar nuevas moléculas de agua y por tanto aumentar su volumen va a ser determinante. En las muestras congeladas a -80°C existirán muchos centros de nucleación, siendo la competencia muy alta. Por tanto, se formarán muchos cristales, pero de menor tamaño. A temperaturas mayores (-20°C), la competencia será menor, debido a que se formaron menos núcleos de cristalización y por tanto el tamaño de los cristales será mayor (Savell et al., 2005).

El número y tamaño de los cristales va a ser el factor principal a la hora de predecir el daño que van a producir en el tejido, de forma que los cristales grandes generan mayor estrés mecánico en las células y tejidos rompiendo sus estructuras básicas. Sin embargo, incluso las muestras ultracongeladas mediante nitrógeno líquido y que se descongelan rápidamente muestran alteraciones, compactaciones y cicatrices en las fibras musculares. Esta degeneración se incrementa con el paso del tiempo, sobre todo si se almacenan a menores temperaturas, pues se producen fenómenos de recrystalización que implican crecimiento de los cristales de hielo mayores a expensas de otros cristales más pequeños que tienden a desaparecer, con la consecuente reducción en el número de cristales totales y el aumento del tamaño medio de los mismos. Cuanto menor sea el tamaño de los cristales, menor será el deterioro de la carne, de forma que a temperaturas muy bajas el fenómeno de recrystalización es muy poco activo mientras que, por el contrario, a temperaturas cercanas al punto de fusión del hielo (0°C) la recrystalización es muy rápida (Savell et al., 2005).

Está confirmado que la recrystalización del hielo en la carne congelada está controlada por la transferencia de moléculas de agua a través de la solución no congelada. Cuando la temperatura es constante, la recrystalización por migración ocurre en una tasa significativa cuando la muestra contiene cristales con diámetros menores de 2 micras y las temperaturas fluctuantes favorecen la recrystalización por migración a través de cristales que tienen mayor tamaño. Es un error pensar que la carne congelada está protegida frente a la acción de las enzimas, ya que muchas de estas continúan actuando a temperaturas

inferiores a -20°C , especialmente las lipasas y fosfolipasas, encargadas de degradar las grasas y que van a provocar el enranciamiento de la grasa y el cambio de su coloración a amarillo (Savell et al., 2005).

1.7. VISIÓN ARTIFICIAL.

Las técnicas convencionales para la cuantificación de características de la carne pretenden objetivar los hallazgos microscópicos, facilitando el intercambio de resultados entre investigadores y el procesamiento estadístico homogéneo de la información obtenida (Gundersen et al., 1982; Gundersen & Jensen, 1983; Anderson & Lowe, 1990). Por lo común, estos métodos son de realización sumamente lenta y la interpretación de los resultados puede ser fácilmente sesgada, aún de forma inconsciente por el observador. Pese a ello hasta la reciente introducción de los métodos de morfometría y visión artificial asistidos por ordenador, han sido ampliamente utilizados en tecnología alimentaria (Brosnan & Sun, 2004).

1.7.1. De la histología a la histometría.

El estudio de muestras histológicas ha sido conectado a la realización de técnicas de tinción de estructuras celulares y a la utilización de criterios de descripción y clasificación muy eficaces pero igualmente subjetivos y en general cualitativos. La aplicación a la histología de técnicas automáticas de medida, fundamentadas en la utilización de cámaras, analizadores de imágenes y archivos para las imágenes digitalizadas, ha permitido sustituir los criterios morfológicos por parámetros morfométricos más objetivos, haciendo de la histología una técnica de investigación cuantitativa. Estas mejoras tecnológicas y la unión de competencias biomédicas, físicas e ingenieriles han transformado la histología en una nueva disciplina conocida como histometría, microscopía digital o visión artificial, que tiene como característica principal el análisis automático de las imágenes, con una gran aplicación en la industria alimentaria (Anderson & Lowe, 1990; Brosnan & Sun, 2004; Viergever & Todd-Pokropek, 1988).

1.7.2. Tinciones de tejidos celulares para la observación óptica.

Las macromoléculas que componen un tejido celular sin teñir, dejando aparte algunas excepciones como por ejemplo los glóbulos rojos de la sangre, no

absorben luz dentro del espectro visible (400 nm - 700 nm de longitud de onda). Por lo tanto para examinar ópticamente un preparado histológico se necesita visualizar sus componentes tiñéndolos. La tinción de un tejido celular se obtiene introduciendo moléculas colorantes que se unen de manera controlada y específica a las macromoléculas o a las organelas celulares de interés, por ejemplo ADN, ARN, mitocondrias, y absorben apreciablemente la luz visible (Morikawa & Yanagida, 1981; Masseroli et al., 1995). De esta manera, en virtud de las diferencias tintoriales, el empleo de técnicas histológicas apropiadas nos permite identificar más correctamente entre las distintas estructuras tisulares.

En videomicroscopía la elección de la tinción tisular resulta de fundamental importancia dado que cuanto más específica sea la tinción para los elementos a examinar, mejor contraste y menor "tinción de fondo" proporcione, tanto más fácil será aplicar con buenos resultados las técnicas de análisis de imagen de segmentación e identificación de objetos de interés. Además, para una correcta evaluación por análisis digital de imagen, se requiere que la tinción sea la más adecuada y reproducible para el tipo de parámetros que se quieren evaluar, densitométricos o morfológicos, y con la menor variabilidad posible, para poder estandarizar técnicas automáticas de elaboración y cuantificación (García del Moral, 1993).

1.7.3. Definición y percepción de imagen.

En morfología microscópica y, de forma genérica, para cualquier proyección plana de un objeto definido por las coordenadas espaciales (x, y, z), la imagen resultante "i" puede considerarse como una función bidimensional $f(x, y)$, dependiente de la intensidad luminosa, donde "x" e "y" representan las coordenadas espaciales de su proyección planimétrica y el valor de "f" es proporcional a la luminosidad de la imagen en dicho punto. Por lo cual decir que $i=f(x, y)$ es equivalente a definir el "nivel de gris" que posee cada uno de los puntos que componen la imagen en blanco y negro. En el caso de las imágenes perceptibles por el ojo humano, los conceptos son similares aunque de mayor complejidad (García del Moral, 1993).

Existen múltiples factores que influyen sobre la percepción visual de una imagen a analizar. Entre ellos pueden mencionarse: a) umbral absoluto de visibilidad; b) existencia de una mínima diferencia apreciable entre el objeto y el fondo; c)

tiempo de adaptación, dependiente de la iluminación previa; d) relación de la imagen percibida respecto de su eje visual y e) la iluminación posterior que recibe el objeto (Attneave, 1954; Levine, 1985).

Todos estos factores definen la agudeza del sistema perceptor de las imágenes, de forma que esta última puede definirse como la capacidad del sistema para detectar los detalles espaciales finos. La agudeza es siempre máxima en el eje visual, si bien para que un campo pueda ser percibido como un subconjunto independiente de puntos que conforman una región diferenciada, comúnmente un objeto sobre el fondo, dicha región debe estar rodeada por unos bordes diferenciables, de forma que los puntos análogos tiendan a seguir las leyes de la semejanza, proximidad, continuación y cierre que han sido ampliamente desarrolladas dentro de la psicología de la percepción visual (Attneave, 1954).

De igual manera, en la percepción visual no todas las regiones aparentemente definidas pueden verse simultáneamente como objetos distintos, sino que existen texturas visuales más visibles que otras. En este sentido, la figura que se percibe suele ser la agrupación puntual que puede describirse usando la mínima información, o lo que es igual, siempre se tiende a resaltar la figura de mayor simplicidad (García del Moral, 1993).

Otros factores de influencia en la percepción visual están provocados por los cambios de tamaño de los objetos al modificarse la distancia entre ellos y el observador, los efectos de desenfoque secundarios a una mala acomodación y, sobre todo, el aumento de ambigüedad que se provoca al transformar las imágenes tridimensionales en su proyección planimétrica (Levine, 1985). Este último punto resulta muy importante también en vídeo microscopía donde se tratan como bidimensionales estructuras tridimensionales, reduciendo los volúmenes a áreas y considerando en el mismo plano estructuras que se sitúan a diferentes niveles de profundidad.

De cualquier forma, aunque las imágenes analizadas en videomicroscopía sean esencialmente proyecciones de estructuras tridimensionales, en la mayoría de los casos se adopta la aproximación de tratarlas simplemente como bidimensionales, representando esas el plano de enfoque más adecuado de los especímenes en examen. La razón fundamental para ello es que el nivel de caracterización al que se pretende trabajar no requiere ningún tipo de información tridimensional. Esto, unido al fuerte costo computacional y de

almacenamiento que tiene el tratamiento de las imágenes, hace que se decida por la aproximación de seleccionar para cada evaluación el mejor plano de enfoque del tejido celular a medir y utilizar la imagen bidimensional resultante como la representación de tal área de tejido.

1.7.4. Técnicas clásicas de microscopía digital.

El estudio de muestras histológicas desde siempre ha estado conectado a la posibilidad de observar objetos de dimensiones próximas o inferiores a la resolución mínima observable por el ojo humano. Por este motivo siempre ha sido de gran importancia en este estudio la mejora de las técnicas clásicas de observación microscópica y la introducción de técnicas nuevas.

Tradicionalmente las técnicas de microscopia que se han utilizado son técnicas clásicas, fundamentadas en la utilización del microscopio óptico. La introducción de la moderna tecnología electrónica y de métodos informáticos las están modificando substancialmente. Actualmente se construyen sistemas integrados donde a la parte óptica tradicional se le sustituye la fuente tradicional de iluminación con fuentes láser, se acoplan sistemas digitales para la captura de imágenes y ordenadores para la elaboración de la imagen digital y el control de todo el sistema (Carazo et al., 1987; Grattarola et al., 1991).

1.7.5. Componentes básicos del análisis de imagen.

1.7.5.1. El microscopio óptico.

El microscopio óptico es un instrumento óptico que, como su nombre indica (del griego *mikrós*, “pequeño”, y *skopein*, “examinar”), permite ver objetos que debido a su pequeño tamaño escapan a la percepción del ojo humano (García del Moral, 1993). El microscopio más utilizado es el microscopio óptico compuesto en el que se combinan los poderes amplificantes de dos lentes o sistemas de lentes, ambos convergentes. Con este instrumento se logran aumentos de 50, 100 ó 1000 veces, o algo más, según la combinación de lentes y la longitud de onda que se emplea para su iluminación. En este instrumento la parte más importante es la óptica, que comprende el sistema de iluminación, los objetivos y los oculares (Quesada & López Hidalgo, 1993).

En el sistema de iluminación, una lámpara halógena emite la luz que, reflejada internamente por un espejo localizado en el eje óptico del microscopio, es

enfocada por el condensador en el preparado en examen. El condensador es una combinación de lentes que no sólo enfoca la luz sobre el objeto, sino suministra también un cono de luz suficiente para la apertura numérica del objetivo. Además, el haz de luz que atraviesa el sistema de lentes puede ser limitado, eliminando los rayos demasiado desviados, utilizando un diafragma-iris regulable manualmente, cuyo centro coincide con el eje óptico.

El objetivo está compuesto por un sistema de lentes convergentes que proporciona una imagen real, aumentada e invertida, del objeto que se observa. El aumento producido depende de cuantas lentes formen parte del objetivo. Además del aumento, una propiedad importante de un objetivo es su poder de resolución (o de separación), es decir, la capacidad de mostrar distintos y separados dos puntos muy próximos. Por consiguiente, cuanto mayor sea el poder de resolución, mayor es la definición de un objeto. Se denomina con límite de resolución R la distancia mínima a la que pueden estar situados dos puntos para su perfecta discriminación (Quesada & López Hidalgo, 1993). El poder de resolución de un objetivo es tanto mayor cuanto menor sea el valor del límite de resolución. De aquí que el aumento de la resolución de una lente pueda conseguirse disminuyendo la longitud de onda de la luz incidente o aumentando la apertura numérica. Como habitualmente la longitud de onda viene fijada, la resolución de un objeto es función de la apertura numérica. Hay una correspondencia aproximada entre el aumento de un objetivo y su apertura numérica, de tal modo que las lentes con mayores aumentos tendrán mayores aperturas numéricas (García del Moral, 1993).

Un factor que afecta la apertura numérica, además de la construcción de la lente es el medio a través del cual pasa la luz. Si el medio interpuesto entre objeto y lente es el aire (objetivo a seco), el valor del índice de refracción es $n=1$. Para obtener una apertura mayor (hecho imprescindible a grandes aumentos), lo que se suele hacer es cambiar el medio y así se utilizan objetivos cuya lente central se sumerge en una gota de sustancia de índice de refracción igual o superior al del vidrio que la constituye ($n=1.33$ para el agua, $n=1.515$ para el aceite de cedro y $n=1.66$ para el monobromuro de naftaleno). La mayoría de estos objetivos de inmersión se usan cuando se requieren niveles de aumento iguales o superiores a 100X y las características de las imágenes que se obtienen son ligeramente diferentes (García del Moral, 1993).

1.7.5.2. Sistemas informáticos para digitalización de imágenes.

Las imágenes necesarias para llevar a cabo el análisis de imagen digital son adquiridas con un sensor de imágenes físicas y un hardware y software determinado es usado para analizar las imágenes con el objetivo de realizar un trabajo visual predefinido (Brosnan & Sun, 2004; Grattarola et al., 1991). Un sistema de análisis de imagen digital generalmente consta de 5 componentes: iluminación, cámara, una tarjeta de captura de imagen, PC y el software necesario (Brosnan & Sun, 2004).

La medida se efectúa generalmente digitalizando la señal de vídeo a través de un convertidor analógico/digital (A/D). La operación de muestreo y digitalización de la señal de vídeo correspondiente a la pantalla entera del monitor de televisión equivale a la subdivisión de la imagen en un tablero de áreas elementales llamadas píxeles. Cada píxel tiene asociado un número, nivel de gris, correspondiente a la luminosidad media del área que el píxel representa, y es individualizado por las coordenadas espaciales que le corresponden en el tablero.

En general el número de píxeles de cada línea y columna de la imagen es un número potencia de dos por comodidad de diseño de la memoria de vídeo. Dado que el número de líneas visualizadas en un monitor de televisión estándar (CCIR monocromático) es de 575, el número de líneas generalmente digitalizadas y almacenadas en memoria es de 512 ($512=2^9$) (Grattarola et al., 1991). La relación entre anchura y altura de un monitor de televisión es de 4/3, por lo cual se necesita tener aproximadamente 767 ($767 = 575 \times 4/3$) píxeles para mantener en horizontal la misma resolución que en vertical. Muestreando cada línea de vídeo en 767 píxeles y guardando los 512 centrales, se obtiene una imagen 512 x 512 píxeles cuadrados. Para hacer eso la frecuencia del muestreador tendrá que ser aproximadamente de 14 MHz, siendo la duración útil de la línea de vídeo de 52 μ s. Sistemas comerciales menos sofisticados utilizan un muestreador de 10 MHz y obtienen las 512 muestras digitalizando toda la línea útil: así el píxel obtenido tiene forma rectangular.

En este sistema, durante la fase de adquisición el convertidor A/D muestrea y digitaliza la señal televisiva almacenando en memoria los niveles de gris de los píxeles así obtenidos. El bloque de conversión D/A lee la memoria a frecuencia

compatible con el estándar televisivo y convierte los niveles de gris en una señal de vídeo que puede ser enviada a un monitor para la visualización de la imagen (Grattarola et al., 1991).

1.7.5.3. Proceso de calibración de medidas.

Con el fin de obtener automáticamente las de medidas de los elementos de las imágenes, es necesario un proceso de calibración que nos ponga en relación las medidas que se obtienen sobre las imágenes digitales, dadas en píxeles, con las útiles para el médico, normalmente representadas en unidades métricas.

La operación de calibrado consiste en determinar, por comparación con una escala conocida (micrómetro), el valor en unidades métricas de una medida en píxeles y calcular factores de conversión entre medidas en píxeles y en unidades métricas (Fernández, 1991). Esto se realiza captando una imagen del micrómetro y midiendo una división conocida de la escala micrométrica.

Este proceso inicial de calibración permite, en todos los algoritmos que conlleven medidas, dar las salidas de éstas en unidades interpretables y útiles desde el punto de vista médico-biológico, en general en micras para las imágenes de videomicroscopía.

1.7.6. Bases de la visión artificial.

De forma general el procesamiento y análisis de imagen es reconocido como la parte fundamental de la visión artificial. La visión artificial es la suma de todo el sistema de análisis, mientras que el procesamiento de imagen implica una serie de operaciones de imagen que resaltan la calidad de determinadas características de la imagen, eliminando sus defectos, como distorsión geométrica, enfoque inadecuado, ruido repetitivo, iluminación no uniforme o movimientos de la cámara. Por otro lado, el análisis de imagen es el proceso de distinción de objetos (regiones de interés) del fondo, generándose información cuantitativa, la cual es utilizada por los sistemas de control para tomar una decisión. El procesamiento y análisis de imagen engloba una serie de pasos, los cuales pueden ser divididos en tres niveles: procesamiento de bajo nivel, procesamiento de nivel intermedio y procesamiento de alto nivel (Brosnan & Sun, 2004).

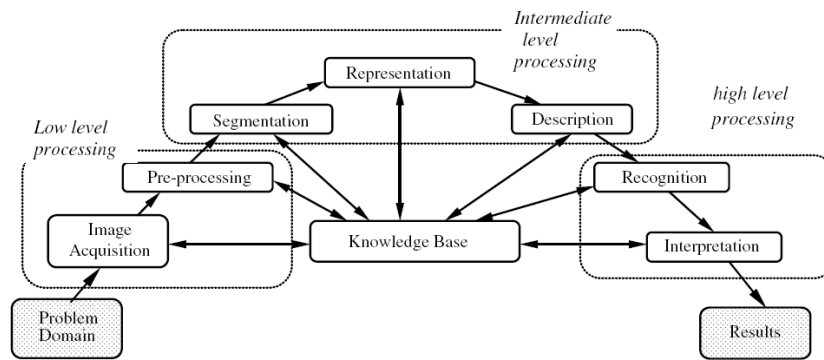


Figura 21. Niveles en el proceso de visión artificial. Tomado de Brosnan & Sun (2004).

El procesamiento de bajo nivel incluye la captación de la imagen y el preprocesamiento. La adquisición de la imagen es la transferencia desde una señal electrónica de la unidad de captura a una forma numérica. El preprocesamiento de imagen conlleva un procesamiento inicial de los datos de la imagen en bruto para la corrección de las distorsiones geométricas, eliminando el ruido, corrigiendo los niveles de gris y corrigiendo el desenfoque (Brosnan & Sun, 2004).

El nivel intermedio de procesamiento incluye la segmentación de la imagen y su representación y descripción. La segmentación de la imagen es uno de los pasos más importantes en todo el procesamiento de imagen, y por tanto la subsecuente extracción de datos es altamente dependiente de la exactitud de esta operación. El objetivo principal es dividir la imagen en regiones que tenga una fuerte correlación con objetos o áreas de interés. La segmentación puede ser lograda por tres diferentes técnicas: umbralización, segmentación basada en los bordes, y segmentación basada en áreas. La umbralización es una técnica sencilla y rápida para caracterizar áreas de la imagen basadas en reflectancia o absorción de la luz constantes de sus superficies. La segmentación basada en bordes se basa en la detección de bordes por operadores de borde, los cuales detectan discontinuidades en los niveles de gris, color, textura, etc. La segmentación basada en áreas implica en agrupar juntos píxeles similares para formar regiones que representen objetos sencillos dentro de la imagen, basándose en criterios de niveles de gris, color y textura. La imagen segmentada puede ser representada como un borde o un área. La representación en borde es susceptible para el análisis de las características de tamaño y perfil, mientras

que la representación por áreas es usada en la evaluación de la textura de la imagen y sus defectos. La descripción o medida de la imagen se encarga de la extracción de la información cuantitativa desde las áreas de imagen previamente segmentadas. Diferentes algoritmos serán usados para el procesamiento de las características morfológicas, texturales y fotométricas cuantificadas (Brosnan & Sun, 2004).

El nivel alto de procesamiento implica el reconocimiento y la interpretación mediante clasificadores estadísticos o redes neuronales multicapa de las regiones de interés. Estos pasos ofrecen la información necesaria para el funcionamiento y control del proceso productivo. La interacción con bases de datos de conocimiento a todos los niveles del proceso global es esencial para la toma de decisiones con mayor precisión y es una parte fundamental en todo el proceso. La operación y efectividad de la toma de decisiones de forma inteligente está basada en el suministro de una base de datos de conocimiento completa, con sistemas de visión artificial incorporado a un ordenador. Algoritmos como redes neuronales, lógica difusa y algoritmos genéticos son algunas de las técnicas de construcción de bases de datos de conocimiento basados en estructuras por ordenador (Brosnan & Sun, 2004).

1.7.7. Aplicación de la visión artificial al estudio de la carne.

Los sistemas de visión artificial han sido usados de forma creciente en la industria de alimentos para la implantación de la calidad. Estos sistemas ofrecen un potencial de automatizar prácticas de clasificación manuales, estandarizando así procesos y eliminando las tediosas tareas de inspección personal. La visión artificial se ha convertido en un sistema objetivo para llevar a cabo cuantificaciones online de numerosos productos alimentarios con aplicaciones desde inspecciones rutinarias a complejos procesos de control guiados robots (Brosnan & Sun, 2004).

En el campo de los productos cárnicos la inspección visual es usada de forma extensiva para el aseguramiento de la calidad, aplicando procesos desde la clasificación inicial de la carne hasta la compra por parte del consumidor. Se han llevado a cabo diversos intentos para usar imágenes para la clasificación de carne, discriminando entre parte magra y grasa, veteado, color y características texturales para la determinación de la ternura de la carne usando regresiones

estadísticas y redes neuronales artificiales. El análisis de imagen ha sido usado igualmente para predecir el tipo de carne, raza del animal y edad, así como a analizar el tejido conectivo intramuscular en imágenes macroscópicas (Brosnan & Sun, 2004).

1.8. NUEVAS TÉCNICAS NO INVASIVAS PARA EL ANÁLISIS DE LA CARNE: REFLECTANCIA ESPECTRAL.

La reflectancia espectral en el rango visible e infrarrojo del espectro (VIS/NIR) se basa en las correlaciones estructura-espectro existentes entre un espectro de medida captado causado por armónicos de las vibraciones moleculares fundamentales ocurridas en dichas franjas del espectro. Estas vibraciones armónicas ocurren a frecuencias únicas dependiendo de la absorción, tipo de moléculas absorbentes presentes en la muestra y el grosor de la misma. El espectro VIS/NIR consiste en sobretonos y combinación de bandas de las absorciones de las moléculas fundamentales encontradas en estas regiones del espectro (Workman, 2005).

Las técnicas de reflectancia espectral aplicadas a los alimentos son de desarrollo relativamente reciente y el procedimiento se basa en registrar la composición espectral de la luz reflejada por una muestra en diferentes longitudes del espectro electromagnético, fundamentalmente en la banda del visible e infrarrojo cercano (350-2.500 nm). VIS/NIRS se ha impuesto en los últimos 30 años como un método rápido y eficaz para evaluar la calidad de los productos cárnicos. Uno de los principales retos dentro de esta industria es la determinación de la autenticidad y pureza de sus productos, permitiendo la posibilidad de integrar la tecnología dentro de un sistema analítico de vigilancia para certificar los productos cárnicos por técnicas de clasificación automática y rápida (Hoving-Bolink et al., 2005; Savenije et al., 2006).

Los consumidores demandan sistemas de control de la calidad exactos y rápidos en las diferentes líneas de producción, emergiendo así las técnicas VIS/NIRS como herramientas para el aseguramiento de la calidad, debido a que los métodos ópticos son no destructivos, rápidos, baratos, portátiles y son considerados como capaces de ser integrados on-line dentro de la cadena productiva, asegurando la calidad desde la granja y el matadero hasta el consumidor final en la filosofía “de la granja a la mesa”, ofreciendo información

exacta y en tiempo real a productores, distribuidores y consumidores (Swatland, 1994; Xia et al., 2007).

El alto grado de expectativas que ha despertado esta técnica se debe a que el método es no invasivo, directo, instantáneo, portátil, de uso fácil y sin preparación de la muestra, además de presentar una alta fiabilidad. En la bibliografía revisada la tecnología VIS/NIRS es usada en ganado porcino para la predicción de grasa intramuscular (Hoving-Bolink et al., 2005; Savenije et al., 2006), composición de ácidos grasos (González-Martín et al., 2003; González-Martín et al., 2005; Fernández-Cabanás et al., 2006), color (Cozzolino et al., 2003) y presencia del alelo genético RN⁻ (Josell et al., 2000), pero no se aplica para la clasificación cualitativa directa entre carnes de diferente calidad, precio y, por tanto, valor gastronómico. Diversos autores usan esta tecnología para la detección de fraudes por mezclas con carnes de menor calidad, especialmente en embutidos (Cozzolino & Murray, 2004; Ortiz-Somovilla et al., 2005; Ortiz-Somovilla et al., 2007).

1.9. REDES NEURONALES ARTIFICIALES.

Las redes neuronales artificiales son un paradigma de aprendizaje y procesamiento automático inspirado en la forma en que funciona el sistema nervioso de los animales. Se trata de un sistema de interconexión de neuronas en una red que colabora para producir un estímulo de salida. Una de las misiones en una red neuronal consiste en simular las propiedades observadas en los sistemas neuronales biológicos a través de modelos matemáticos recreados mediante mecanismos artificiales (como un circuito integrado, un ordenador o un conjunto de válvulas). El objetivo es conseguir que las máquinas den respuestas similares a las que es capaz el cerebro que se caracterizan por su generalización y su robustez (Sánchez, 2006).

Una red neuronal se compone de unidades llamadas neuronas. Cada neurona recibe una serie de entradas a través de interconexiones y emite una salida. Esta salida viene dada por tres funciones:

- a) Una función de propagación (también conocida como función de excitación), que por lo general consiste en el sumatorio de cada entrada multiplicada por el peso de su interconexión (valor neto). Si el peso es

positivo, la conexión se denomina excitatoria; si es negativo, se denomina inhibitoria.

- b) Una función de activación, que modifica a la anterior. Puede no existir, siendo en este caso la salida la misma función de propagación.
- c) Una función de transferencia, que se aplica al valor devuelto por la función de activación. Se utiliza para acotar la salida de la neurona y generalmente viene dada por la interpretación que queramos darle a dichas salidas.

Con un paradigma convencional de programación en ingeniería del software, el objetivo del programador es modelar matemáticamente (con distintos grados de formalismo) el problema en cuestión y posteriormente formular una solución (programa) mediante un algoritmo codificado que tenga una serie de propiedades que permitan resolver dicho problema. En contraposición, la aproximación basada en las redes neuronales parte de un conjunto de datos de entrada suficientemente significativo y el objetivo es conseguir que la red aprenda automáticamente las propiedades deseadas. En este sentido, el diseño de la red tiene menos que ver con cuestiones como los flujos de datos y la detección de condiciones, y más que ver con cuestiones tales como la selección del modelo de red, la de las variables a incorporar y el preprocesamiento de la información que formará el conjunto de entrenamiento. Asimismo, el proceso por el que los parámetros de la red se adecuan a la resolución de cada problema no se denomina genéricamente programación sino que se suele denominar entrenamiento (Sánchez, 2006).

Por ejemplo, en una red que se va a aplicar al diagnóstico de imágenes médicas. Durante la fase de entrenamiento el sistema recibe imágenes de tejidos que se sabe son cancerígenos y tejidos que se sabe son sanos, así como las respectivas clasificaciones de dichas imágenes. Si el entrenamiento es el adecuado, una vez concluido, el sistema podrá recibir imágenes de tejidos no clasificados y obtener su clasificación sano/no sano con un buen grado de seguridad. Las variables de entrada pueden ser desde los puntos individuales de cada imagen hasta un vector de características de las mismas que se puedan incorporar al sistema (por ejemplo, procedencia anatómica del tejido de la imagen o la edad del paciente al que se le extrajo la muestra (Sánchez, 2006)).

Biológicamente, un cerebro aprende mediante la reorganización de las conexiones sinápticas entre las neuronas que lo componen. De la misma manera, las redes neuronales tienen un gran número de procesadores virtuales interconectados que de forma simplificada simulan la funcionalidad de las neuronas biológicas. En esta simulación, la reorganización de las conexiones sinápticas biológicas se modela mediante un mecanismo de pesos, que son ajustados durante la fase de aprendizaje. En una red neuronal entrenada, el conjunto de los pesos determina el conocimiento de esa red neuronal y tiene la propiedad de resolver el problema para el que la red neuronal ha sido entrenada (Sánchez, 2006).

Por otra parte, en una red neuronal, además de los pesos y las conexiones, cada neurona tiene asociada una función matemática denominada función de transferencia. Dicha función genera la señal de salida de la neurona a partir de las señales de entrada. La entrada de la función es la suma de todas las señales de entrada por el peso asociado a la conexión de entrada de la señal. Las redes neuronales tienen la habilidad de aprender mediante una etapa que se llama etapa de aprendizaje. Esta consiste en proporcionar a la red neuronal datos como entrada a su vez que se le indica cuál es la salida (respuesta) esperada. Para cada tipo de aprendizaje encontramos varios modelos propuestos por diferentes autores:

- Aprendizaje supervisado: necesitan un conjunto de datos de entrada previamente clasificado o cuya respuesta objetivo se conoce.
- Aprendizaje no supervisado o autoorganizado: no necesitan de tal conjunto previo.
- Redes híbridas: son un enfoque mixto en el que se utiliza una función de mejora para facilitar la convergencia. Un ejemplo de este último tipo son las redes de base radial.

1.10. BIBLIOGRAFÍA.

Anderson, J.M., & Lowe, J. (1990). Histometry and image analysis. En: Bancroft JD, Stevens A, eds. *Theory and practice of histological techniques*. London: Churchill Livingstone, 597-618.

Aparicio Tovar, M.A., & Vargas Giraldo, F.D. (2006). Considerations of ethics and animal welfare in extensive pig production: Breeding and fattening Iberian pigs. *Livestock Science*, Vol. 103, nº 3, 237-242.

Attneave, F. (1954). Some informational aspects of visual perception. *Psychology Review*, 61, 183-193.

Bailey, A.J., & Light, N.D. (1989). Connective tissue in meat and meat products. London: Elsevier Applied Science.

Bailey, A.J., Paul, R.G., & Knott, L. (1998). Mechanisms of maturation and ageing of collagen. *Mechanisms of Ageing and Development*, 106, 1-56.

Bekhit, A.E.D., & Faustman, C. (2005). Metmyoglobin reducing activity. *Meat Science*, 71, 407-439.

BOE, 15 de octubre del (2001). Real Decreto 1083/2001, de 5 de Octubre, Norma de calidad para el jamón ibérico, paleta ibérica y caña de lomo ibérico elaborados en España.

Bourne, M. (1982). Food texture and viscosity: Concepts and measurements. Academic Press.

Bouton, P.E., Harris, P.V., & Ratcliff, D. (1981). Effect of cooking temperature and time on the shear properties of meat. *Journal of Food Science*, 46, 1082-1087.

- Brooke, M.H., & Kaiser, K.K. (1970). Three myosin adenosin triphosphatase systems: the nature of their pH lability and sulphhydryl dependence. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 18, 670-672.
- Brosnan, T., & Sun, D.W. (2004). Improving quality inspection of food products by computer vision – a review. *Journal of Food Engineering*, 61, 3-16.
- Carazo, J.M., Jiménez, J., Secilla, J.P., Carascosa, J.L. (1987). Computer visualization of biological structures. *American Biotechnology Laboratory*, 1, 48-55.
- Carpenter, Z.L., Kauffman, R.G., Bray, R.W., Briskey, E.J., & Weckel, K.G. (1963). Factors influencing quality in pork A. Histological observations. *Journal of Food Science*, 28, 467–471.
- Carroll, R.J., Rorer, F.P., Jones, S.B., & Cavanaugh, J.R. (1978). Effect of tensile stress on the ultrastructure of bovine muscle. *Journal of Food Science*, 43, 1181-1187.
- Cava, R., Ruiz, J., Ventanas, J., & Antequera, T. (1999). Oxidative and lipolytic changes during ripening of Iberian hams as affected by feeding regime: extensive feeding and alpha-tocopheryl acetate supplementation *Meat Science*, 52, 165-172.
- Christensen, M., Purslow, P.P., & Larsen, L.M. (2000). The effect of cooking temperature on mechanical properties of whole meat, single muscle fibers and perimysial connective tissue. *Meat Science*, 55, 301-307.
- Cooper, C.C., Breidenstein, B.B., Cassens, R.G., Evans, G., & Bray, R.W. (1968). Influence of marbling and maturity on the palatability of beef muscle II. Histological considerations. *Journal of Animal Science*, 27, 1542–1546.

- Cotran, R.S., Kumar, V., & Collins, T. (2000). Robbins: Patología Estructural y Funcional. *Editorial McGraw-Hill Interamericana*, Sexta Edición.
- Cozzolino, D., Barlocco, N., Vadell, A., Ballesteros, F., & Gallieta, G. (2003). The use of visible and near-infrared reflectance spectroscopy to predict colour on both intact and homogenised pork muscle. *LWT – Food Science and Technology*, 36, 195-202.
- Cozzolino, D., & Murray, I. 2004. Identification of animal meat muscles by visible and near infrared reflectance spectroscopy. *LWT – Food Science and Technology*, 37, 447-452.
- Craig, R., & Woodhead, J.L. (2006). Structure and function of myosin filaments. *Current Opinion in Structural Biology*, 16, 204-212.
- Daza, A., Mateos, A., Rey, A.I., Ovejero, I., & López-Bote, C.J. (2007). Effects of duration of feeding under free-range conditions on production results and carcass and fat quality in Iberian pigs. *Meat Science*, 76, 411-416.
- De Pedro, E. (1999). Índices de calidad para una clasificación objetiva de canales de cerdo ibérico. *I Jornadas sobre el cerdo ibérico y sus productos*, Salamanca, 22-25 de junio de 1999.
- Diéguez, E. (1999). La raza porcina ibérica: sus estirpes y selección. *I Jornadas sobre el cerdo ibérico y sus productos*, Salamanca, 22-25 de junio de 1999.
- Dransfield, E. (1977). Intramuscular composition and texture of beef muscles. *Journal of Science Food Agriculture*, 28, 833-842.
- Essén-Gustavson, B., & Fjelkner-Modig, S. (1985). Skeletal muscle characteristics in different breeds of pigs in relation to sensory properties of meat. *Meat Science*, 13, 33-47.

- Fawcett, D.W. (1987). Bloom-Fawcett: Tratado de Histología. *Editorial McGraw-Hill Interamericana*, Undécima Edición.
- Fennema, O.R. (2000). Química de los alimentos. *Editorial ACRIBIA*, 2ª Edición.
- Fernández J. (1991). Identificación automática de rasgos en imágenes microscópicas. Tesis doctoral. Universidad de Granada.
- 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, E., & Dardenne, P. (2006). Optimisation of the spectral pre-treatments used for Iberian pig fat NIR calibrations. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 87, 104-112.
- Flint, O. (1994). Microscopía de los alimentos: manual de métodos prácticos utilizando la microscopía óptica. *Editorial ACRIBIA*, 1ª Edición.
- García del Moral, R. (1993). Laboratorio de Anatomía Patológica. *Interamericana-McGraw – Hill*. 1ª Edición.
- Gaspar, P. Escribano, M., Mesías, F.J., Rodríguez de Ledesma, A., & Pulido, F. (2007). Sheep farms in the Spanish rangelands (dehesa): Typologies according to livestock management and economic indicators. *Small Ruminant Research*, doi:10.1016/j.smallrumres.2007.03.013.
- Geesink, G.H., & Koohmaraie, M. (1999). Postmortem proteolysis and calpain/calpastatin activity in callipyge and normal lamb *biceps femoris* during extended postmortem storage. *Journal of Animal Science*, 77, 1490-1501.

- González-Martín, I., González-Pérez, C., Álvarez-García, N., & González-Cabrera, J.M. (2005). On-line determination of fatty acids 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.
- Grattarola, M., Cambiaso, A., Esposito, M., & Paradiso, R. Citometria in assorbimento e fluorescenza. Bioingegneria cellulare e molecolare. *Patron Editore*, 1991, 19-26.
- Gundersen, H.J.G., Bendtsen, T.F., Korbo, L., Marcussen, N., Møller, A., Nielsen, K., Nyengaard, J.R., Pakkenberg, B., Sørensen, F.B., Vesterby, A., et al. (1982). Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS*, 96, 379-394.
- Gundersen, H.J.G., & Jensen, E.B. (1983). Particle sizes and their distributions estimated from line- and point-sampled intercepts, including graphical unfolding. *Journal of Microscopy*, 131, 291-310.
- Honikel, K.O. (1997). Reference methods supported by OECD and their use in Mediterranean meat products. *Food Chemistry*, 59, 573-582.
- 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., & Lambooij, en E. (2005). Perspective of NIRS measurements early post mortem for prediction of pork quality. *Meat Science*, 69, 417-423.
- Huff-Lonergan, E., & Lonergan, S.M. (2005). Mechanisms of water-holding capacity of meat: The role of postmortem biochemical and structural changes. *Meat Science*, 71, 194-204.

- Huff-Lonergan, E., Mitsuhashi, T., Beekman, D.D., Parrish, F.C., Olson, D.G., & Robson, R.M. (1996). Proteolysis of specific muscle structural proteins by mu-calpain at low pH and temperature is similar to degradation in postmortem bovine muscle. *Journal of Animal Science*, 74, 993-1008.
- Hunt, M.C., Sørheim, O., & Slinde, E. (1999). Color and heat denaturation of myoglobin forms in ground beef. *Journal of Food Science*, 64, 847-851.
- John, L., Cornforth, D.P., Carpenter, C.E., Sørheim, O., Pettee, B.C., & Whittier, D.R. (2004). Comparison of color and thiobarbituric acid values of cooked hamburger patties after storage of fresh beef chubs in modified atmospheres. *Journal of Food Science*, 69, 608-614.
- Josell, A., Martinsson, L., Borggaard, C., Andersen, J. R., & Tornberg, E. (2000). Determination of RN⁻ phenotype in pigs at slaughter-line using visual and near-infrared spectroscopy. *Meat Science*, 55, 273-278.
- Karlsson, A.H., Klont, R.E., & Fernández, X. (1999). Skeletal muscle fibres as factors for pork quality. *Livestock Production Science*, 60, 255-269.
- Koohmaraie, M. (1994). Muscle proteinases and meat aging. *Meat Science*, 36, 93-104.
- Lefaucheur, L., & Gerrard, D. (1998). Muscle fiber plasticity in farm mammals. *Muscle Ultrastructure, Development and Fiber Plasticity*, 2, 1-19.
- Lepetit, J., Grajales, A., & Favier, R. (2000). Modelling the effect of sarcomere length on collagen thermal shortening in cooked meat: consequence on meat toughness. *Meat Science*, 54, 239-250.
- Levine MD. Vision in man and machine. *McGraw-Hill*, 1985.

- Lewis, G.J., & Purslow, P.P. (1989). The strength and stiffness of perimysial connective tissue isolated from cooked beef muscle. *Meat Science*, 26, 255-269.
- Lewis, G.J., Purslow, P.P., & Rice, A.E. (1991). The effect of conditioning on the strength of perimysial connective tissue dissected from cooked meat. *Meat Science*, 30, 1-12.
- Lien, R., Hunt, M.C., Anderson, S., Kropf, D.H., Loughin, T.M., Dikeman, M.E., et al. (2002). Effects on endpoint temperature on the internal color of pork patties of different myoglobin form, initial cooking state, and quality. *Journal of Food Science*, 67, 1011-1015.
- Light, N.D., Champion, A.E., Voyle, C., & Bailey, A.J. (1985). The role of epimysial, perimysial and endomysial collagen in determining texture of six bovine muscles. *Meat Science*, 13, 137-149.
- Lillford, P.J. (2000). The materials science of eating and food breakdown. *MRS Bulletin 2000*, 36-43.
- Mancini, R.A., & Hunt, M.C. (2005). Current research in meat color. *Meat Science*, 71, 100-121.
- MAPA (2004). www.mapa.es.
- Masseroli, M. (1995). Manual del programa de análisis de imagen FIBROSIS HR para la cuantificación de la fibrosis intersticial. *Master Diagnóstica*.
- McCormick, R.J. (1994). The flexibility of the collagen compartment of muscle. *Meat Science*, 36, 79-91.
- Møller, A. (1980). Analysis of Warner-Bratzler shear force pattern with regard to myofibrillar and connective tissue components of tenderness. *Meat Science*, 5, 247-260.

- Morikawa, K., & Yanagida, Y. (1981). Visualization of individual DNA molecules in solution by light microscopy: DAPI staining method. *Biochemistry*, 89, 693-696.
- Mutungi, G.M., Purslow, P.P., & Warkup, C. (1996). Influence of temperature, fibre diameter and conditioning on the mechanical properties of raw and cooked single muscles fibres extended to fracture. *Journal of Science Food Agriculture*, 72, 358-366.
- Nakamura, Y.N., Iwamoto, H., Ono, Y., Shiba, N., Nishimura, S., & Tabata, S. (2003). Relationship among collagen amount, distribution and architecture in the M. *longissimus thoracis* and M. *pectoralis profundus* from pigs. *Meat Science*, 64, 43-50.
- Niñoles, L., Clemente, G., Ventanas, S., & Benedito, J. (2007). Quality assessment of Iberian pigs through backfat ultrasound characterization and fatty acids composition. *Meat Science*, 76, 102-111.
- O'Brien, J., Nursten, H., Crabbe, M.J.C., & Ames, J. (1998). The Maillard reaction in foods and medicine. *The Royal Society of Chemistry*.
- Ortiz-Somovilla, V., España-España, F., De Pedro-Sanz, E.J., & Gaitán-Jurado, A.J. (2005). Meat mixture detection in Iberian pork sausages. *Meat Science*, 71, 490-497.
- 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.
- Ouali, A., & Talmant, A. (1990). Calpains and calpastatin distribution in bovine, porcine and ovine skeletal muscles. *Meat Science*, 28, 331-348.

- Pearson, A.M., & Young, R.B. (1989). Muscle and Meat Biochemistry. *Editorial Academic Press*.
- Poste, L.M., Butler, G., Mackie, D., Agar, V.E., Thompson, B.K., Cliplef, R.L., & McKay, R.M. (1993). Correlations of sensory and instrumental meat tenderness values as affected by sampling technique. *Food Quality and Preference*, 4, 207-214.
- Purslow, P.P. (1985). The physical basis of meat texture: observations on the fracture behaviour of cooked bovine M. *semitendinosus*. *Meat Science*, 12, 39-60.
- Purslow, P.P. (1989). Strain-induced reorientation of an intramuscular connective tissue network: Implications for passive muscle elasticity. *Journal of Biomechanics*, 22, 21-31.
- Purslow, P.P. (2005). Intramuscular connective tissue and its role in meat quality. *Meat Science*, 70, 435-447.
- Quesada, M.J. López Hidalgo, J. (1993). El microscopio. En: García Del Moral R, ed. Laboratorio de Anatomía Patológica. *Interamericana - McGraw-Hill*, 143-150.
- Ramírez, J.A. (2004). Características bioquímicas del músculo, calidad de la carne y de la grasa de conejos seleccionados por velocidad de crecimiento. *Tesis doctoral*. Universidad Autónoma de Cataluña.
- Ramírez, M.R., & Cava, R. (2007). Effect of Iberian X Duroc genotype on dry-cured loin quality. *Meat Science*, 76, 333-341.
- Richardson, P. (2001). Thermal technologies in food processing. *CRC Press*.
- Rosenthal, A.J. (2001). Textura de los alimentos: Medida y percepción. *Editorial ACRIBIA*.

- Rosselló, V. (2003). El cerdo ibérico: crianza, productos y gastronomía en la Sierra de Aracena y Picos de Aroche (Huelva). *Iniciativas Leader Sierra de Aracena y Picos de Aroche, S.A.*
- Ruusunen, M., & Puolanne, E. (2004). Histochemical properties of fibre types in muscles of wild and domestic pigs and the effect growth rate on muscle fibre properties. *Meat Science*, 67, 533-539.
- Ruiz-Carrascal, J., Ventanas, J., Cava, R., Andrés, A., & García, C. (2000). Texture and appearance of dry-cured ham as affected by fat content and fatty acids composition. *Food Research International*, 33, 91-95.
- Sánchez, E.N. (2006). Redes neuronales: conceptos fundamentales y aplicaciones a control automático. *Editorial Pearson Educación.*
- Savell, J.W., Mueller, S.L., & Baird, B.E. (2005). The chilling of carcasses – Review. *Meat Science*, 70, 449-459.
- Savenije, B., Geesink, G.H., van der Palen, J.G.P., & Hemke, G. (2006). Prediction of pork quality using visible/near-infrared reflectance spectroscopy. *Meat Science*, 73, 181-184.
- Seyfert, M., Hunt, M.C., Mancini, R.A., Kropf, D.H., & Stroda, S.L. (2004). Internal premature browning in cooked steaks from enhanced beef round muscles packaged in high-oxygen and ultralow oxygen modified atmospheres. *Journal of Food Science*, 69, 142-146.
- Shorthose, W.R., & Harris, P.V. (1990). Effect of animal age on the tenderness of selected beef muscles. *Journal of Food Science*, 55, 1-14.
- Sosniki, A.A., Wilson, E.R., Sheiss, E.B., & de Vries, A. (1998). Ist there a cost effective way to produce high quality pork? *Reciprocal Meat Conference Proceedings*, Vol. 51.

- Stanton, C., & Light, N. (1987). The effects of conditioning on meat collagen: Part I – Evidence for gross in situ proteolysis. *Meat Science*, 21, 249-265.
- Swatland, H.J. (1994). Physical measurements of meat quality: optical measurements, pros and cons. *Meat Science*, 36, 251-259.
- Swatland, H.J., Gullett, E., Hore, T., & Battenham, S. (1995). UV fiber-optic probe measurements of connective tissue in beef correlated with taste panel scores for chewiness. *Food Research International*, 28, 23–30.
- Terlouw, C. (2005). Stress reactions at slaughter and meat quality in pigs: genetic background and prior experience. A brief review of recent findings. *Livestock Production Science*, 94, 125-135.
- Tørngren, M.A. (2003). Effect of packing method on color and eating quality of beef loin steaks. *Proceedings 49th International Congress of Meat Science and Technology*, 495-496.
- Tornberg, E. (1996). Biophysical aspects of meat tenderness. *Meat Science*, 43, S175-S191.
- Tornberg, E. (2005). Effects of heat on meat proteins. Implications on structure and quality meat products. *Meat Science*, 70, 493-508.
- Torrescano, G., Sánchez-Escalante, A., Giménez, B., Roncales, P., & Beltrán, J.A. (2003). Shear values of raw samples of 14 bovine muscles and their relation to muscle collagen characteristics. *Meat Science*, 64, 84-91.
- Ventanas, S., Ventanas, J., Ruiz, J., & Estévez, M. (2005). In Iberian pigs for the development of high-quality cured products. *Recent research in development in agricultural and food chemistry*, 27–53.

- 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*, doi:10.1016/j.meatsci.2007.04.001.
- Viergever, M.A., & Todd-Pokropek, A. (1988). Mathematics and computer science in medical imaging. *Berlin: Springer Verlag*.
- Workman, J. (2005). An introduction to near infrared spectroscopy. <http://www.spectroscopynow.com/coi/cda/detail.cda?id=1881&type=EducationFeature&chId=2&page=1> (accesible el 12 de abril de 2007).
- Xia, J.J., Berg, E.P., Lee, J.W., & Yao, G. 2007. Characterizing beef muscles with optical scattering and absorption coefficients in VIS-NIR region. *Meat Science*, 75:78-83, 2007.
- Zamaratskaia, G., Babol, J., Andersson, H., & Lundström, K. (2004). Plasma skatole and androsterone levels in entire male pigs and relationship between boar taint compounds, sex steroids and thyroxine at various ages. *Livestock Production Science*, 87, 91-98.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El aumento del conocimiento, apreciación y sofisticación de los consumidores e industrias cárnicas, así como la progresiva implementación de estrictos sistemas de control de calidad en mataderos y productores cárnicos ha obligado a mejorar la calidad de las características organolépticas a lo largo de todo los procesos, siendo necesaria la aplicación de alta tecnología para el control de los mismos. La base del aseguramiento de la calidad en la industria alimentaria ha sido normalmente una suma de parámetros subjetivos frecuentemente evaluados por paneles de cata e inspectores de producto. Estos parámetros, como pueden ser apariencia, gusto, textura y flavor, son de carácter subjetivo y dependen de la percepción humana, representando alto coste, inconsistencia y variabilidad inter e intraobservador.

Los recientes sistemas automáticos de inspección y aseguramiento de la calidad, basados mayoritariamente en visión artificial macroscópica, se han mostrado como una tecnología alternativa y de gran validez a las tradicionales inspecciones, representando una herramienta fundamental para el aseguramiento de la calidad y la estandarización de la producción en la industria alimentaria. La apariencia de la carne debida al color y a la apariencia visual es el factor más importante para el consumidor a la hora de realizar la compra y es por ello que la industria necesita tecnologías eficientes para la evaluación de la calidad de la carne de cerdo. Pero la mayoría de las características de la carne están determinadas a nivel submacroscópico, y por tanto la aplicación de visión artificial a nivel microscópico puede otorgar un acercamiento más real a estos problemas.

La tecnología de reflectancia espectral en el rango del visible e infrarrojo cercano ha sido usada en el sector del cerdo ibérico para la detección de fraudes por mezclas con carnes de menor calidad, especialmente en embutidos. Además de esta aplicación directa, esta tecnología de reflectancia espectral es usada en ganado porcino para la predicción de la grasa intramuscular, composición de ácidos grasos, color y presencia del alelo genético RN⁻, pero no se aplica para la clasificación cualitativa directa entre carnes de diferente calidad y precio y, por tanto, con distinto valor gastronómico.

El punto débil de la visión artificial aplicada a cortes histológicos es el obligatorio proceso de destrucción de la muestra para su análisis mediante su inclusión en parafina o secciones criostáticas, la dificultad para detectar fraudes y

adulteraciones y el tiempo necesario para el procesamiento de las muestras y su cuantificación. Es por ello que la utilización conjunta de la visión artificial sobre cortes microscópicos de tejido muscular estriado y la técnica rápida, no destructiva y de bajo coste de reflectancia espectral puede suponer un paso fundamental para asegurar la calidad de la carne de cerdo ibérico en los centros productores, mataderos e industrias cárnicas en general.

Ha sido nuestro propósito durante el desarrollo de esta tesis doctoral diseñar procedimientos informáticos específicos para este tipo de análisis a través del desarrollo de los siguientes OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Diseñar, desarrollar e implementar en entorno compatible con Windows una aplicación de visión artificial para la cuantificación objetiva y automática de la distribución y porcentaje del tejido conectivo intramuscular, grasa intramuscular y tejido muscular estriado en las carnes habitualmente manejadas para la alimentación humana, empleando como muestra patrón diferentes especies animales.
- Analizar comparativamente las diferencias morfométricas obtenidas entre las distintas especies animales y los diferentes músculos estudiados a partir de la tinción de secciones micrométricas de las mismas con rojo Sirio.
- Evaluar la idoneidad del procedimiento morfométrico diseñado para el estudio de la carne de cerdo ibérico.
- Aplicar la tecnología de reflectancia espectral en el rango del visible e infrarrojo cercano para el estudio de la carne de cerdo ibérico y desarrollar sistemas informáticos avanzados basados en redes neuronales artificiales para el análisis de los datos obtenidos.
- Estudiar comparativamente el patrón de reflectancia espectral en el músculo *masseter* de cerdo blanco e ibérico.

- Realizar el análisis comparativo de los resultados obtenidos en el objetivo anterior aplicando redes neuronales artificiales para la clasificación objetiva y automática de las dos razas de cerdo estudiadas.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS.

A continuación y a modo de resumen se describen brevemente los materiales y métodos usados para el desarrollo de este estudio, haciendo referencia a los apartados de los Capítulos de Resultados en donde se puede encontrar las referencias y procedimientos exactos de los experimentos.

En el experimento detallado en el Capítulo I de la sección Resultados se trabajó con 30 animales de 6 especies diferentes (descrito con más detalle en el apartado 4.1.3.1.): cerdos blancos de la raza híbrida Large White, sacrificados con un peso medio de canal de 100-110 Kg.; cerdos Ibéricos con un peso medio de canal de 160-175 Kg.; corderos con un peso medio de canal de 9-11 Kg.; vacuno mayor de la raza Rubia Gallega con un peso medio de canal de 450 Kg.; buey de Kobe con un peso medio de canal de 550-570 Kg. y pichones con un peso medio de canal de 0,45-0,50 kg.

Para el estudio histológico, como se detalla en el apartado 4.1.3.2., se tomaron secciones histológicas (2x2x0.5 cm.) de músculo crudo de *longissimus thoracis*, *masseter* (vacuno), *triceps brachii* (cordero) y *pectoralis major* (pichón). Los tejidos fueron fijados en formalina tamponada al 4% y embebidos en parafina. Posteriormente se hicieron cortes seriados a 4- μ m y se procedió a su desparafinación. Las tinciones histológicas llevadas se llevaron a cabo por la técnica de hematoxilina-eosina y rojo Sirio.

Como se describe más detenidamente en el apartado 4.1.3.3., para el análisis de imagen se usaron 75 imágenes por muestra capturadas con una cámara Vidamax CCD BCD-700 acoplada a un microscopio BH-2 con un adaptador MTV-3. Se usaron lentes intermedias de 3.3x aumentos y objetivos de 10x y 20x aumentos, con una magnificación total de 100x y 200x, respectivamente. Para la toma de imágenes con la tinción histológica roja Sirio se usó un filtro verde IF 550. En todos los casos, las imágenes fueron capturadas con sobreexposición de luz para incrementar el contraste y eliminar las áreas con niveles de gris cercanos al blanco.

Para el análisis de imagen, como se detalla con más detenimiento en el apartado 4.1.3.3.2., se usó un PC con procesador Intel Pentium-4 a una velocidad de 3.20 GHz, 1 GB de RAM, tarjeta gráfica S-VGA de 1 MB, tarjeta MPEG Meteor II/Standard para la captura y procesamiento de la imagen y

monitor FLATRON L1730S. El procesamiento de imagen y las operaciones informáticas fueron desarrolladas en Windows XP Professional con algoritmos originales implementados usando el software Visilog 6.0 para el desarrollo de programas de análisis de imagen compilados en lenguaje Turbo C 2.0.

Como se describe en el apartado 4.1.3.4., el análisis estadístico se llevó a cabo aplicando el test de Kolmogorov-Smirnov para asegurar la distribución normal de las variables. Tras el análisis descriptivo, se aplicó el test de Correlación de Spearman, test de Kruskal-Wallis y el test U de Mann-Whitney para determinar la significación estadística. El intervalo de confianza fue del 98% ($p < 0.05$) y se usó el programa SPSS-Windows 11.0.

En los experimentos detallados en los Capítulos II y III de la sección Resultados de esta tesis doctoral (apartados 4.2.3.1., 4.2.3.2., 4.2.3.3. y 4.3.3.1.), se trabajó con 30 animales de porcino, 15 de la raza híbrida blanca y otros 15 de raza ibérica. Los cerdos blancos fueron sacrificados con 6 meses de edad y pesos medios de canal de 85 Kg., mientras que los cerdos ibéricos se sacrificaron a una edad de 12-14 meses, con pesos medios de canal de 125 kg. Tras el desangrado de los animales, se refrigeraron a 4°C las canales durante 2 horas para la inspección veterinaria y el análisis higiénico-sanitario de las canales. Tras la aprobación veterinaria se procedió al deshuesado en caliente y la extirpación del músculo *masseter*, que fue envasado al vacío y refrigerado a 4°C durante 72 horas, simulando el tiempo medio de transporte hasta los puntos de venta al consumidor. 3 horas antes de las cuantificaciones se procedió a eliminar las condiciones de vacío para permitir la oxigenación de la carne y evitar estados anómalos de oxidación de la mioglobina.

Como se detalla en el apartado 4.3.3.2., el músculo *masseter* presenta características histológicas especiales, dignas de ser reseñadas. Macroscópicamente se puede observar un gran desarrollo del tejido conectivo intramuscular, especialmente a nivel del perimysio. Esto es consecuencia derivada de la gran potencia muscular del músculo *masseter*, el cual es frecuentemente en los mamíferos uno de los músculos con mayor capacidad de contracción. La fascia externa es de aspecto magro, con un pequeño veteado en su superficie. Su histología macroscópica es muy homogénea, con un largo predominio de fibras musculares estriadas frente al tejido conectivo o

adiposo. Por contra, la fascia interna del músculo, que delimita la cavidad oral, muestra un veteado muy extendido, con grandes vetas de tejido conectivo intramuscular y grasa de varios milímetros de grosor.

Para llevar a cabo la cuantificación de reflectancia espectral se usó, como se describe en el apartado 4.3.3.3., un espectrorradiómetro portátil FieldSpec Pro JR con un rango de reflectancia espectral de 350-2.500 nm con una sonda de contacto acoplada FieldSpec Pro FR de 2 cm. de diámetro y una reflectancia especular máxima del 5%. Se calibró el nivel de blanco con un Spectralón de referencia con un 100% de capacidad de reflectancia. La captación de los espectros se llevó a cabo a las 72 horas post mortem del animal y aplicando directamente la sonda de contacto sobre los lados magro y veteado de todas las muestras del músculo *masseter*.

Para el análisis de datos mediante redes neuronales artificiales se han usado algoritmos de información mutua (ver en los Capítulos II y III los apartados 4.2.3.1. y 4.3.4.1., respectivamente) y redes neuronales de funciones de bases radiales (ver en los Capítulos II y III los apartados 4.2.3.2. y 4.3.4.2., respectivamente).

4. RESULTADOS

El capítulo I está basado en el artículo:

Image analysis application for automatic quantification of intramuscular connective tissue in meat.

F.G. del Moral, F. O'Valle, M. Masseroli, & R.G. del Moral.

Publicado en **Journal of Food Engineering**, Vol. 81, Nº 1, Julio de 2007, páginas 33-41.

4.1. CAPÍTULO I

Image Analysis Application for Automatic Quantification of Intramuscular Connective Tissue in Meat

F.G. del Moral ^a, F. O'Valle ^a, M. Masseroli ^b, & R.G. del Moral ^{a,*}.

^aDepartment of Pathology, School of Medicine, University of Granada,
18012 Granada, Spain.

^bDepartment of Biomedical Engineering, Politecnico di Milano, Piazza
Leonardo da Vinci 32, I-20133 Milano – Italy.

Correspondence:

Raimundo G. del Moral, MD, PhD.

Dpto. de Anatomía Patológica,

Facultad de Medicina,

18012 Granada, Spain.

Tel: + 34-958-24-35-09.

Fax: + 34-958-24-35-10

E-mail: rgarcia@ugr.es

4.1.1. ABSTRACT.

An image analysis application for the quantification of meat intramuscular connective tissue (IMCT) and fibre retraction is presented. This image analysis method was applied to microscopic images of Sirius red-stained tissue sections from various animal species (pig, cow, pigeon, and lamb), including different breeds of pig (Large White crossbreed and Iberian) and cow (Kobe and Rubia Gallega). Results obtained showed statistically significant differences among the species in area and percentage of IMCT, *perimysium* and fibre retraction in meat ($p < 0.001$, Kruskal Wallis). Significant differences were also observed between the two breeds of pig in percentages of IMCT (4.00 ± 2.15 vs. 17.02 ± 14.99 ; $p = 0.028$, Mann-Whitney U test) and *perimysium* (22.59 ± 0.87 vs. 9.93 ± 4.95 ; $p = 0.009$, Mann-Whitney U test) in *longissimus thoracis* (LT). This original design software permits the accurate, objective, reliable and fully reproducible quantification of IMCT and fibre retraction in meat.

KEYWORDS: Image analysis, Sirius red, intramuscular connective tissue, *perimysium*, muscle fibre retraction, meat, beef, Kobe beef, pork, Iberian pork, pigeon, lamb.

4.1.2. INTRODUCTION.

Image analysis was recently described as a highly promising approach for objectively assessing meat freshness and for the on-line quality control of industrial meat products (Du & Sun, 2004; Ötles & Önal, 2004; Swatland, 1995; Wyle, Vote, Roeber, Cannell, Belk, Scanga et al., 2003). In fact, it has been used since the early 1980s (Cross, Gilliland, Durland & Seideman, 1983; Wassenberg, Allen & Kemp, 1986) to determine crude fat content, colour, lean yield estimate, marbling and textural properties and to relate these results to the palatability and tenderness of cooked meats (Tan, 2004; Vote, Belk, Tatum, Scanga & Smith, 2003).

The search for meat tenderness has long captured the attention of research groups and meat producers. Chandraratne, Samarasinghe, Kulasiri & Bickerstaffe (2005) define the tenderness of meat as its resistance to shear, or toughness. Many studies have focussed on muscle fibre, but there has also been considerable investigation of intramuscular connective tissue (IMCT), which has been shown to be a critical factor in meat tenderness. Swatland (2006) concluded that the strength of the strongest *perimysium* in aged beef roasts is more than twice the sum of the endomysial and myofibrillar strength. In a recent review of IMCT studies, Purslow (2005) reported the morphology, composition and amount of IMCT vary enormously among muscles, species, breeds and animals of different ages.

Studies of IMCT by imaging analysis and microscopy have recently been published, notably by Sifre, Berge, Engel, Martin, Bonny, Listrat, Taylor & Culioli (2005) and Sifre-Maunier, Taylor, Berge, Culioli & Bonny (2006). These authors accepted the equivalent importance of the two main structural constituents of muscle tissue (myofibres and IMCT) and concluded that structural studies were required to predict meat tenderness and instrumental toughness. According to Sifre-Maunier et al. (2006), if the contribution of the myofibres to meat toughness is limited by proper post-mortem handling, the contribution of the IMCT predominates, especially after an adequate ageing period, and the feature of IMCT is mostly determined by the amount and heat solubility of collagen and its spatial organisation in the muscle.

These studies have opened up a highly productive line of research line into the architecture of IMCT and the possibility of obtaining highly precise and objective measurements based on microscopy and imaging analysis.

This paper presents a new automatic image analysis method based on digital analysis designed to quantitatively study the area of IMCT and fibre retraction in Sirius-red and hematoxylin-eosin-stained histological sections of meat, respectively. This software, originally designed for biomedical applications, permits the accurate, objective, reliable, and fully reproducible quantification of areas of IMCT or muscle fibre retraction in meat and enables assessment of other parameters not adequately studied to date.

4.1.3. MATERIAL AND METHODS.

4.1.3.1. Animals.

A total of 30 male animals were studied. Five each of commercially available Large White crossbreed pigs (100-110 kg), Iberian pigs (160-175 kg), lamb (9-11 kg), Rubia Gallega cows (around 450 kg), Kobe steers (550-570 kg) and pigeons (0.45-0.50 kg) were raised in Spain under standard commercial production systems and subjected to normal husbandry practices. In Iberian pigs, a traditional “hot deboning” was applied to carcasses and sampling was carried out within one hour after slaughter.

4.1.3.2. Histologic study.

Five transverse histologic sections (2x2x0.5 cm) of raw muscle tissue were taken from each animal, from *longissimus thoracis* (LT) (at 10th rib of pork, beef, and lamb), *masseter* (M, beef), *triceps brachii* (TB, lamb) and *pectoralis major* (PM, pigeon). Tissues were fixed in buffered 4% formalin (Panreac, Barcelona, Spain) and embedded in paraffin; 4- μ m sections were kept after deparaffinization for 48 hours in 70% alcohol before their simultaneous staining with 1% picro Sirius red F3BA (Gurr, BDH Chemicals Ltd., Poole, United Kingdom) for 30 min. Using Sirius red, connective tissue is stained a deep red colour and nuclei and cytoplasmic muscle structures are stained light red and bright yellow, respectively (Sweat, Puchtler & Rosenthal, 1964). This staining was used to assess area and percentage of *epimysium*, *perimysium*, *endomysium*, i.e., the main components of IMCT. Serial sections were also

stained using standard hematoxylin-eosin technique to evaluate the extent of muscle fibre retraction.

4.1.3.3. Image analysis morphometric study

4.1.3.3.1 *Image Capture*

Seventy-five images per sample were captured with a black and white Vidamax CCD BCD-700 video camera (ImaGesp, Barcelona, Spain) coupled to an Olympus BH-2 microscope (20 watt) with MTV-3 adapter (Olympus Optical Company, Ltd., Tokyo, Japan). Use of an intermediate lens (3.3x) and 10x or 20x power objectives yielded a total magnification of 100x or 200x, respectively. Analog images were captured through an IF 550 green optical filter (Olympus) and digitized at 8 bits intensity resolution (256 grey levels) (Figure 1). For all measurements, the light intensity of the microscope was set at 7, video camera gain was 230, focus aperture was completely open and camera offset was set at 0. The diaphragm aperture was 0.25 for muscle fibre retraction quantification, 0.20 for IMCT and 0.32 for *perimysium*. In all cases, the images were captured with light overexposure to increase contrast and eliminate areas with grey levels close to white.

4.1.3.3.2. *Image Processing*

The image analysis system consisted of a PC with Pentium-4, 3.20 GHz processor, 1 Gbytes Ram, S-VGA 1 Mbyte graphics card, Meteor II/Standard MPEG card (Matrox Electronics System, Ltd., Dorval, Canada) for image capture and processing, and a FLATRON L1730S monitor (LG, Seoul, Korea). Image processing and computer operations were performed in Windows XP Professional environment (Microsoft Corporation, Redmond, Washington) with original algorithms implemented using Visilog 6.0 software (Noesis S.A. Courteboeuf, France) for the development of image analysis programmes with programme compiler in C language: Turbo C 2.0 (Borland International Inc.).

4.1.3.4. Statistical analysis.

The Kolmogorov-Smirnov test was used to assess the normal distribution of the variables. After the descriptive analysis, Spearman correlation (Rho), Kruskal Wallis, and Mann-Whitney U test analyses were performed to determine the

statistical significance. The confidence interval was 95% ($p < 0.05$). The statistical analysis was performed using the SPSS-Windows 11.0 programme (SPSS Inc., Chicago, USA).

4.1.4. RESULTS AND DISCUSSION.

4.1.4.1. Programme.

A computer programme was adapted for the automatic quantification of IMCT and fibre retraction in microscopic images of meat tissue. The application consisted of the following modules (Figure 1): Automatic Capture, Automatic Thresholding, Morphologic Filtering Algorithm, IMCT Area Identification and Image Analysis.

4.1.4.1.1 Automatic capture.

This enables capture and improvement of the microscopic image by removing grey levels of the preparation in areas without tissue and normalizing the grey histogram of the image, highlighting Sirius red- or hematoxylin-eosin-stained connective tissue areas. To avoid interference causing by irregular lighting and camera lens aberrations, the shading in the digitized image was corrected by comparing the image pixel-by-pixel with a previously acquired background image and the corrected image was then normalized.

4.1.4.1.2. Automatic Thresholding.

Automatic segmentation of areas intensely stained by Sirius red or hematoxylin-eosin was carried out using the global thresholding method of Kurita, Otsu & Abdelmalek (1992). In images of meat stained with Sirius red, captured with excess light and pre-processed as previously described, thresholding yielded a binary image representing the extracellular matrix of the muscle interstitium (made up of different types of collagen and nonfibrillar proteins) and the muscle cells. A second algorithm using Kittler & Illingworth thresholding (Kittler & Illingworth, 1986) was implemented on the initial image for detecting lower grey levels, in order to isolate areas weakly stained with Sirius red and not segmented by Kurita's method.

4.1.4.1.3. Morphologic Filtering Algorithm.

An original algorithm was designed to extract IMCT from thresholded image elements. In the interstitial region of the image, areas of IMCT were identified as those elements with surface area $> 35 \mu\text{m}^2$. Smaller elongated IMCT areas were separated from round muscle cell nuclei by using dilation and “hit or miss” and Boolean operations, and were classified as elongated objects when they had a “geodesic length” of more than 13 pixels ($\approx 11 \mu\text{m}$) (Figure 2).

The geodesic length was determined by means of an algorithm that iteratively combined logical and mathematical morphology operations on the binary image representing the mask of the elements contained in the image (Figure 3). The algorithm initially determined the centroids of the objects in the image and successively, by iteration of logical operations and dilation, the centroids were dilated by reconstructing the initial objects and producing an image in which each pixel of each isolated element was assigned a grey level equal to the geodesic distance between that pixel and the pixel furthest from the same element. Centroids of objects were determined by iteratively applying the “*Thinning*” mathematical morphology operation to the binary images of the objects until convergence (i.e., until no modifications in the resulting image were produced between two successive iterations) and by using elements representing the so-called D configuration in all possible rotations as structural elements. Hole-filling was obtained iteratively by using the negative of the negative image of the objects without holes according to the sequence “*Dilation*” and “*And*” applied to the image frame and negative of the initial image with holes (Figure 4).

4.1.4.1.4. IMCT Area Identification.

IMCT was identified using an automatic mathematical morphology algorithm. Initially, the binary image complement of the previously thresholded areas was automatically processed by a sequence of mathematical morphology “hit or miss” transformations (Figure 5).

4.1.4.1.5. Fibre retraction.

The total area occupying the area is calculated by the software. Muscle fibre retraction is quantified on the negative of the hematoxylin-eosin-stained images.

4.1.4.1.6. Image Analysis.

Segmented image elements of interest were quantified in μm^2 , and the percentage area of IMCT was calculated as follows: $\text{IMCT} = 100 \times \text{CA}/\text{IA}$, where CA is the connective area, and IA is the area of the whole image.

4.1.4.1.7. Algorithm Training.

For the training of the algorithm, 300 images were used to determine the optimal microscope condenser aperture settings for the capture and digitalization of images and the image analysis. The images were visually evaluated and also automatically quantified, determining the % connective tissue area. Tukey's penalization and the Newman-Keuls method was used for multiple comparisons between mean values of pairs of images captured with the same diaphragm aperture, finding no significant differences in evaluations with apertures between positions 1.5 and 6 ($p > 0.1$). These evaluations were repeated after an interval of several days and the results of both were analysed by calculating the percentage of intra- and interobserver agreement in the determination of optimum aperture range, finding no significant differences.

4.1.4.1.8. Software validation.

Our group previously developed and validated applications based on the same methodology and data processing to quantify interstitial fibrosis in liver and kidney (Masseroli, Caballero, O'Valle, Del Moral, Pérez-Milena & Del Moral, 2000; Masseroli, O'Valle, Andújar, Ramírez, Gómez-Morales & de Dios Luna, 1998). The robustness of the nonlinear image processing algorithms used was demonstrated by the evaluation of images experimentally perturbed to simulate slight progressive increases and decreases in stained areas. Quantifications of different areas showed strong correlations with the degree of image perturbation. The values were distributed in an almost linear manner, with small oscillations due mainly to the automatic thresholding algorithm. These fluctuations produced differences in histologic quantifications, but these were within the limits of precision of available tissue sectioning and staining techniques. Similarly, Sirius red staining was chosen for its reproducibility and stability and its virtual absence of artefacts and background. Moreover, the possible intra- and inter-observer variability was tested with different statistical

tests, obtaining an intra-observer agreement of >95% and inter-observer agreement of >90%. The lack of a standard for tissue staining intensity prevents the automatic normalization of image acquisition illumination according to this parameter, so that any possible batch differences in staining intensity can be compensated only by the interactive tuning of image acquisition illumination. This practice can lead to inter-assay differences that bias the reproducibility and objectivity of quantifications. Digital image normalization and the use of our acquisition control function ensure the total intra-observer reproducibility of image acquisition illumination settings. The efficacy of acquisition control function in improving the objectivity and reproducibility of condenser aperture setting was tested by repeating the visual evaluation of the same images using the control function. The intra- and interoperator reproducibility of the acquisition illumination was validated in a study by Masseroli et al. (1998), based on visual evaluations by four expert independent observers. Each observer twice defined the range of microscope condenser apertures that gave images with the most appropriate intensity for subsequent automatic evaluation. The same images were also automatically evaluated to determine the range of microscope condenser apertures that gave quantifications that did not differ significantly. To assess the accuracy of the proposed automatic method, values of connective tissue obtained in the same images by means of Kurita et al's (1992) automatic thresholding were compared with manual thresholding reference values and the results of three other global automatic thresholding methods: Kittler and Illingworth's method with Gaussian distribution of gray levels (1986), Kittler and Illingworth's with Poisson's distribution of gray levels, and the corrected isodata method. The present programme uses similar conditions of capture and the same logical operations, mathematical morphology, and image analysis as but was specifically designed to study meat tissue parameters.

4.1.4.2. Application.

Several authors have reported a good correlation between imaging analysis and biochemical hydroxyproline determination in the quantification of collagen, confirming the accuracy of the former approach (Kalaria & Pax, 1995; Nicoletti, Heudes, Mandet, Hinglais, Bariety & Michel, 1996; Sifre et al., 2005; Sifre-Maunier et al., 2006). Compared with conventional methods, imaging analysis

yields additional information on parameters related to the arrangement and architecture of IMCT that could not previously be evaluated, besides providing a more precise quantification of standard variables.

Table 1 lists the means and statistical significance of morphometric parameters analyzed in meat of the different species. Statistically significant differences were found in the percentage and area occupied by IMCT among the different muscles and animal species studied ($p < 0.001$, Kruskal Wallis). M of Rubia Gallega beef had the largest area of IMCT ($p = 0.009$, Mann-Whitney U test), followed by LT of Iberian pork, LT of lamb, TB of lamb, LT of Kobe beef, PM of pigeon and LT of Rubia Gallega beef.

Data on the % of total collagen area occupied by *perimysium* in LT obtained by Nakamura, Iwamoto, Ono, Shiba, Nishimura & Tabata (2003) in castrated male pigs ((Landrace x Duroc)♀ x Duroc♂) were relatively similar (25.4%±0.9 in type I collagen and 37.6%±1.0 in type III collagen) to the present observations in Large White crossbred pigs (% *perimysium* 22.59±0.87) despite the different histologic technique and different magnifications used (2x by Nakamura et al. versus 20x in the present study). The question arises as to whether IMCT is a fractal system.

Two recent studies (Sifre et al., 2005; Sifre-Maunier et al., 2006) used the same histologic technique as the present study (Sirius red staining), although they used cryopreserved rather than paraffin-embedded samples. Both studies stained IMCT collagen in LT with Sirius red, applying a green optical filter to improve the contrast and using Visilog software for image analysis. The only difference between the present research and these studies was the observation scale and breeds of animal studied. Thus, they acquired images at 2x magnification, whereas we used 10x magnification for IMCT and 20x magnification for *perimysium* and fibre retraction.

In studies of the % of total muscle area occupied by IMCT, Sifre et al. (2005) reported a % IMCT of 2.8±0.4 (threshold confidence level (ϵ) of 0.80) in LT of 5-year-old Charolais cull cows and Sifre-Maunier et al. (2006) % IMCT values of 3.1 and 14.0 in LT of 3-7-year-old Charolais cows for ϵ values of 0.80 and 0.55, respectively. We found % IMCT of 3.20±0.98 in LT of Rubia Gallega cows (450 kg) and 4.37±1.20 in Kobe beef (550-570 kg). Our findings in Rubia Gallega cows were in agreement with those reported by Sifre et al. (2005) and Sifre-

Maunier et al. (2006), despite the use of different observation scales. These results again raise the question as to whether IMCT is a fractal system. It is highly probable that the greater presence of IMCT in Kobe beef is due to the higher age of these animals and their diet.

Perimysium size also significantly differed among the different muscles ($p < 0.001$, Kruskal Wallis). The area occupied by the *perimysium* was significantly larger in M of Rubia Gallega beef compared with the other samples ($p < 0.05$, Mann-Whitney U test) and was smallest in LT of Kobe beef ($p < 0.05$, Mann-Whitney U test). We found statistically significant differences in Sirius red-stained meat tissue (LT) between Large White crossbreed and Iberian pigs). Iberian pork had a higher % IMCT (17.02 ± 14.99 vs. 4.00 ± 2.15 ; $p = 0.028$, Mann-Whitney U test), whereas the Large White pork presented a higher % *perimysium* (22.59 ± 0.87 vs. 9.93 ± 4.95 ; $p = 0.009$, Mann-Whitney U test).

Significant differences species in the degree of muscle fibre retraction were observed among the different animals ($p < 0.001$, Kruskal-Wallis). The greatest degree of retraction was observed in LT of Kobe beef and the least in LT of lamb. Significant differences were also found among different muscles in the same species ($p < 0.05$, Mann-Whitney U test). The degree of retraction was not correlated with the area of IMCT or *perimysium* in any sample studied (non-significant Spearman's Rho).

Sifre et al. (2005), using an adaptive thresholding method based on probabilistic maps and a confidence level (degree of freedom of the algorithm) of 80%, reported that models were less efficient when segmentation extracting the thinner network was performed (lower confidence level; $\epsilon = 40\%$). Sifre-Maunier et al. (2006) used probabilistic map thresholding (PMT) and found a wide variability in results according to the confidence level used (ϵ) to determine the optimal threshold. At high confidence (ϵ) levels (70, 75 and 80%), corresponding to the thick network, the standard error was increased (to > 3 gray levels); at low ϵ levels, the thickness of secondary segments (thinnest segments) was over-estimated (Sifre-Maunier et al., 2006). They reported that PMT thresholding rules depend on the ϵ level, whereas Rosin's thresholding algorithm and Otsu's algorithm are only adaptive to the image context and give a single threshold value regardless of the ϵ value (Sifre-Maunier et al., 2006). Pir application, based on a modification of Otsu's algorithm, gives a single

threshold value, which we consider essential for intra- and interobserver reliability and the reproducibility of results. Sifre-Maunier et al. (2006) found that Rosin's thresholding algorithm and Otsu's algorithm did not take account of the thinnest segments, which were segmented at confidence levels below 70%. This error was corrected by applying a second algorithm using Kittler & Illingworth thresholding (Kittler & Illingworth, 1986). This was implemented on the initial image to detect lower grey levels and isolate weakly stained areas not segmented by Kurita's method. Sifre-Maunier et al. (2006) concluded that the limiting factor of the PMT method is the learning step to build the thresholding rules, which must be changed for every modification of acquisition conditions. In our software, the digital image normalization and acquisition control function ensure total intra-observer reproducibility of image acquisition conditions, and the present study validated the efficacy of the acquisition control function in improving the objectivity and reproducibility of condenser aperture setting. Sifre-Maunier et al. (2006) confirmed the high sensitivity of the PMT method to a heterogeneous background at low ϵ , since it selects lighter grey levels to obtain thinner segments and therefore tends to binarize false background noise. Our software corrects for this potential problem by comparing the image pixel-by-pixel with a previously acquired background image and producing a corrected image.

In the study by Sifre-Maunier et al. (2006), 20 non-trained judges drew what they thought to be IMCT by using a one-pixel-thick black line). The intra- and inter-operator reproducibility was validated in the present study by using four independent expert observers, who showed no significant differences in results ($p < 0.05$; Masseroli et al., 1998). Sifre-Maunier et al. (2006) concluded that non-expert judges could be trained to produce more consensual drawings.

The meat of the different animals presented highly similar gross features but showed clear microscopic differences. It is widely accepted that organoleptic (especially textural) variability among different animal meats can mainly be explained by differences in the composition and arrangement of muscle fibres and IMCT. Meat quality attributes such as meat colour, marbling, maturity, IMCT and meat texture can be effectively quantified and predicted to a satisfactory degree of accuracy. Image processing has been used to assess beef quality in terms of the percentage of marbling area, using morphological

operations to separate connected meat tissues and measure the marbling area. However, research has shown that marbling and colour characteristics only explain a rather low percentage of the variations in important palatability measures such as tenderness (Li, Tan, Martz & Heymann, 1999; Li, Tan & Shatadal, 2001). Wheeler, Vote, Leheska, Shackelford, Belk, Wulf, Gwartney & Koochmaraie (2002) concluded that non-invasive methods to predict meat tenderness based primarily on lean colour may not be sufficiently accurate to warrant their use. IMCT quantity and spatial distribution, which define the grain of meat, are of great importance among the multiple meat tissue characteristics that influence meat quality because they are directly related to its tenderness (Lepetit & Culioli, 1994). Thus, there is a clear correlation between total collagen content and muscle toughness and a high positive correlation between Warner-Bratzler Shear Force and total collagen content ($r=0.723$; $P<0.01$; Torrescano, Sánchez-Escalante, Giménez, Roncalés, & Beltrán, 2003).

New methods are required to predict meat tenderness and classify meat type, breed, and age in order to accurately identify beef that can be guaranteed to be tender. Although further studies are required, these findings indicate that automatic image analysis of microscopy sections is a highly promising and versatile method to discriminate the components of a given tissue.

4.1.5. CONCLUSION

This image analysis application permits the automatic, accurate, objective and reliable quantification of IMCT and fibre retraction in muscle. It can analyze 20 images per min and offers more precise measurements compared with conventional morphometric methods. Changes in the physicochemical properties of meat have a histologic basis. Variations in the proportion of IMCT, the greater or lesser retraction of muscle fibres, loss of water from the tissue and/or the degree of cell autolysis can modify the organoleptic characteristics of meat. The use of the present technique to precisely quantify these parameters will help to increase understanding of these relationships and enable study of the architecture and IMCT of meat for clarifying tissue changes that result from different storage, refrigeration, freezing and cooking conditions.

4.1.6. ACKNOWLEDGMENTS

We would especially like to acknowledge the contribution of María Dolores Rodríguez, Francisca Sáez and Mercedes García-Román, technicians at the Department of Pathology. Special thanks to Andoni Luis Adúriz, Chef of Mugaritz Restaurant (Guipúzcoa, Spain), for his collaboration in this paper. This work was funded by the Corporación Tecnológica de Andalucía.

4.1.7. REFERENCES.

- Basset, O., Buquet, B., Abouelkaram, S., Delachartre, P., & Culioli, J. (2000). Application of texture image analysis for the classification of bovine meat. *Food Chemistry*, 69, 437-445.
- Brosnan, T., & Sun, D. (2003). Improving quality inspection of food products by computer vision- a review. *Journal of Food Engineering*, 61, 3-16.
- Cross, H. R., Gilliland, D. A., Durland, P. R., & Seideman, S. (1983). Beef carcass evaluation by use of a video image analysis system. *Journal of Animal Science*, 57(4), 910-917.
- Du, C., & Sun, D. (2004). Shape extraction and classification of pizza base using computer vision. *Journal of Food Engineering*, 64, 489-496.
- Jiang, X., Irniger, C., Bunke, H. (2000). Design of training/test data sets for empirical performance evaluation. *Proc. 2nd Workshop on Empirical Evaluation Methods in Computer Vision, Dublin*, 25-36. Phillips, P.J., and Christensen, H. (eds).
- Kalaria, R.N., & Pax, A.B. (1995) Increased collagen content of cerebral microvessels in Alzheimer's disease. *Brain Research*, 705, 349-352.
- Kittler, J., & Illingworth, J. (1986). Minimum error thresholding. *Pattern Recogn*, 19, 41-47.
- Kurita, T., Otsu, N., & Abdelmalek, N. (1992). Maximum likelihood thresholding based on population mixture models. *Pattern Recogn*, 25, 1231-1240.
- Lee, S., Moyer, G.H., & Kelly, S. (1991). Interactive static image analysis: a major enhancement to histopathology and cytology. *Clinical Laboratory Manage Review*, 5, 120-125.

- Lepetit, J., & Culioli, J. (1994). Mechanical properties of meat. *Meat Science*, 36, 203-237.
- Li, J., Tan, J., Martz, F., & Heymann, H. (1999). Image texture feature as indicators of beef tenderness. *Meat Science*, 53, 17-22.
- Li, J., Tan, J., & Shatadal, P. (2001). Classification of tough and tender beef by image texture analysis. *Meat Science*, 57, 341-346.
- Masseroli, M., Caballero, T., O'Valle, F., Del Moral, R.M., Pérez-Milena, A., Del Moral, R.G. (2000) Automatic quantification of liver fibrosis: design and validation of a new image analysis method: comparison with semi-quantitative indexes of fibrosis. *Journal of Hepatology*, 32(3), 453-64.
- Masseroli, M., O'Valle, F., Andújar, M., Ramírez, C., Gómez-Morales, M., de Dios Luna, J., Aguilar, M., Aguilar, D., Rodriguez-Puyol, M., Del Moral, R.G. (1998). Design and validation of a new image analysis method for automatic quantification of interstitial fibrosis and glomerular morphometry. *Laboratory Investigation*, 78(5), 511-22.
- Nakamura, Y.N., Iwamoto, H., Ono, Y., Shiba, N., Nishimura, S., & Tabata, S. (2003). Relationship among collagen amount, distribution and architecture in the M. *longissimus thoracis* and M. *pectoralis profundus* from pigs. *Meat Science*, 64, 43-50.
- Nicoletti, A., Heudes, D., Mandet, C., Hinglais, N., Bariety, J., & Michel, J.B. (1996) Inflammatory cells and myocardial fibrosis: spatial and temporal distribution in renovascular hypertensive rats. *Cardiovascular Research*, Volume 32, Issue 6, 1096-1107.
- Ötles, S., & Önal, A. (2004). Computer-aided engineering software in the food industry. *Journal of Food Engineering*, 65, 311-315.

- Purslow, P.P. (2005). Intramuscular connective tissue and its role in meat quality – Review. *Meat Science*, 70, 435-447.
- Sifre, L., Berge, P., Engel, E., Martin, J.F., Bonny, J.M., Listrat, A., Taylor, R., & Culioli, J. (2005). Influence of the spatial organization of the perimysium on beef tenderness. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 8390-8399.
- Sifre-Maunier, L., Taylor, R.G., Berge, P., Culioli, J., & Bonny, J.M. (2006). A global unimodal thresholding based on probabilistic reference maps for the segmentation of muscle images. *Image and Vision Computing*, article in press.
- Steiner, R., Vote, D.J., Belk, K.E., Scanga, J.A., Wise, J.W., Tatum, J.D., & Smith, G.C. (2003). Accuracy and repeatability of beef carcass *longissimus muscle* area measurements. *Journal of Animal Science*, 81, 1980-1988.
- Sun D., & Du C. (2004). Segmentation of complex food images by stick growing and merging algorithm. *Journal of Food Engineering*, 61, 17-26.
- Swatland, H.J. (1995). Objective assessment of meat yield and quality. *Trends in Food Sciences and Technology*, v. 6, 117-120.
- Swatland, H.J. (2006). Stratification of connective tissue toughness in beef roasts assessed by simultaneous fluorometry and penetrometry. *Food Research International*, Article in Press available online at www.sciencedirect.com.
- Sweat, F., Puchtler, H., & Rosenthal, S.I. (1964). Sirius red F3BA as a stain for connective tissue. *Archives of Pathology*, 78, 69-72.
- Tan, J. (2004). Meat quality evaluation by computer vision. *Journal of Food Engineering*, 61, 27-35.

- Vote, D.J., Belk, K.E., Tatum, J.D., Scanga, J.A., & Smith, G.C. (2003). Online prediction of beef tenderness using a computer vision system equipped with a BeefCam module1. *Journal of Animal Science*, 81, 457–465.
- Wasseberg R. L., Allen D. M., & Kemp, K. E. (1986). Video image analysis prediction of total kilograms and percent primal lean and fat yield of beef carcasses. *Journal of Animal Science*, 62(6), 1609-1616.
- Wheeler, T.L., Vote, D., Leheska J.M., Shackelford, S.D., Belk, K.E., Wulf, D.M., Gwartney; B.L., & Koochmarai, M. (2002). The efficacy of three objective systems for identifying beef cuts that can be guaranteed tender. *Journal of Animal Science*, 80, 3315-3327.
- Wyle, A.M., Vote, D.J., Roeber, D.L., Cannell, R.C., Belk, K.E., Scanga, J.A., Goldberg, M., Tatum J.D., & Smith, G.C. (2003). Effectiveness of the SmartMV prototype BeefCam System to sort beef carcasses into expected palatability groups. *Journal Animal of Science*. 81, 441-448.

Table 1. Morphometric parameters in the different meat tissues studied using the digital image analysis application.

Parameters	Table 1: Morphometric parameters in the different meat tissues studied using the digital image analysis application										P value
	<i>Triceps brachii</i> (Lamb)	<i>Longissimus thoracis</i> (Lamb)	<i>Masseter</i> (<i>Bos taurus</i> Rubia Gallega beef)	<i>Longissimus thoracis</i> (<i>Bos taurus</i> Rubia Gallega beef)	<i>Pectoralis major</i> (Pigeon)	<i>Longissimus thoracis</i> (Kobe beef)	<i>Longissimus thoracis</i> (Iberian pork)	<i>Longissimus thoracis</i> (Large white crossbreed pork)			
% IMCT	7.53 ± 1.95	8.43 ± 4.29	28.75 ± 10.63	3.20 ± 0.98	4.11 ± 2.24	4.37 ± 1.20	17.02 ± 14.99	4.00 ± 2.15			0.001
IMCT (µm ²)	4530.96 ± 1173.79	5070.49 ± 2580.10	17293.49 ± 6393.30	1926.39 ± 587.88	2476.28 ± 1340.45	2627.47 ± 725.46	10238.13 ± 9014.84	2406.11 ± 1294.70			0.001
% <i>Pertinysium</i>	13.78 ± 4.21	20.65 ± 1.50	75.07 ± 17.10	3.00 ± 2.11	7.66 ± 1.17	5.82 ± 2.81	9.93 ± 4.95	22.59 ± 0.87			0.001
<i>Pertinysium</i> Area (µm ²)	8289.90 ± 2533.18	12419.74 ± 902.70	45150.30 ± 10283.31	1804.18 ± 1267.05	4609.27 ± 705.28	3498.74 ± 1693.511	5971.09 ± 2974.71	13587.70 ± 521.79			0.001
% Fiber retraction	13.27 ± 2.81	3.16 ± 2.30	11.86 ± 3.40	17.12 ± 1.67	11.52 ± 2.34	22.69 ± 0.30	20.16 ± 3.08	13.45 ± 3.69			0.001
Area Fiber retraction (µm ²)	52163.38 ± 1688.13	58243.26 ± 1383.28	53014.37 ± 2048.37	49847.73 ± 1008.06	53218.26 ± 1408.31	46495.47 ± 181.11	48020.55 ± 1853.97	52053.50 ± 2216.58			0.001
Mean ± Standard Deviation											

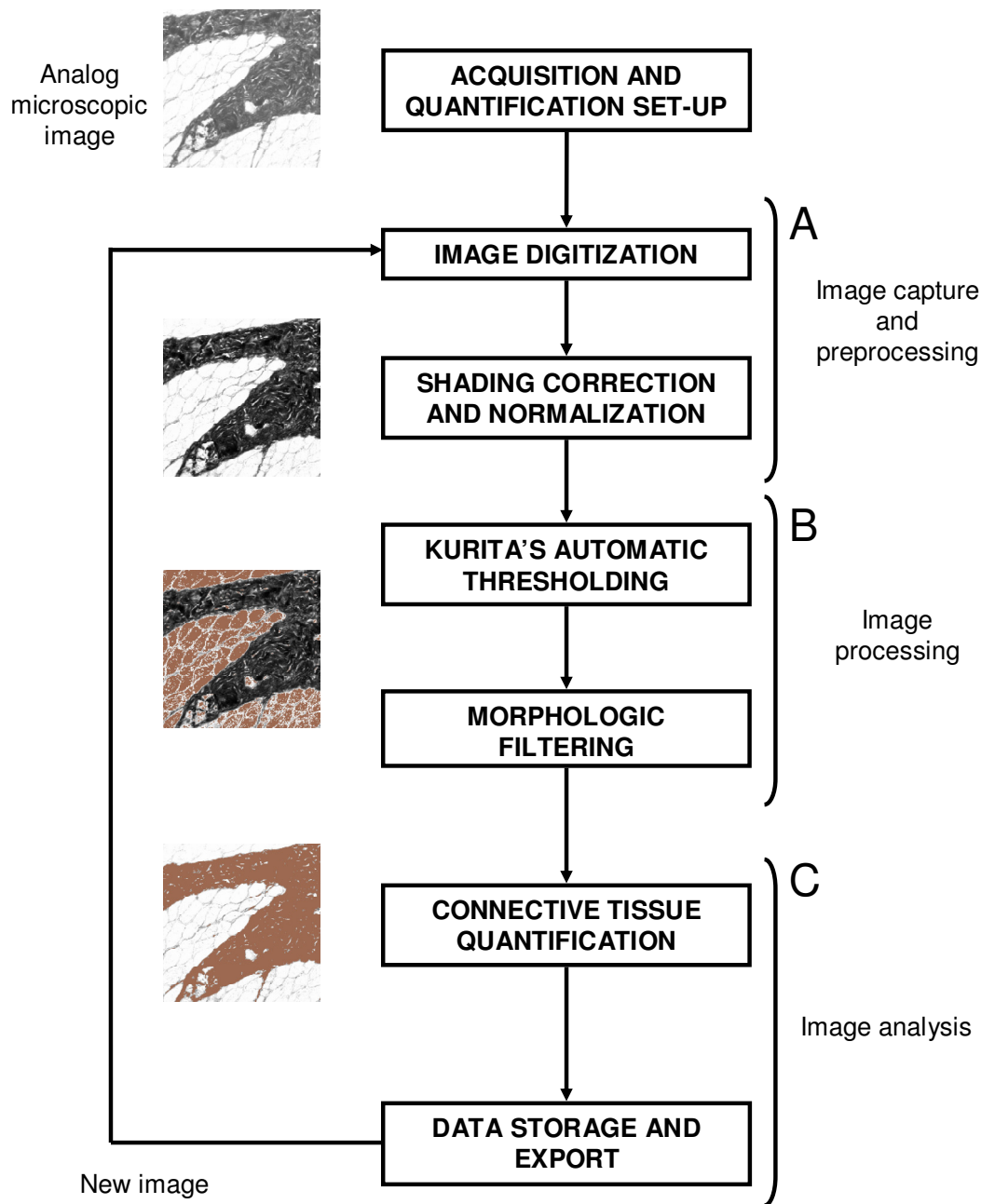


Figure 1. Flow chart of image analysis application for automatic quantification of IMCT, showing main components of the image analysis application developed to automatically quantify intramuscular connective tissue in meat sections. The programme is implemented in three parts: (A) capture and pre-processing of digital image, (B) processing of pre-processed image, and (C) analysis of processed image and measurement of parameters. Black-white microscopic images of M of Rubia Gallega beef (Sirius red, x10).

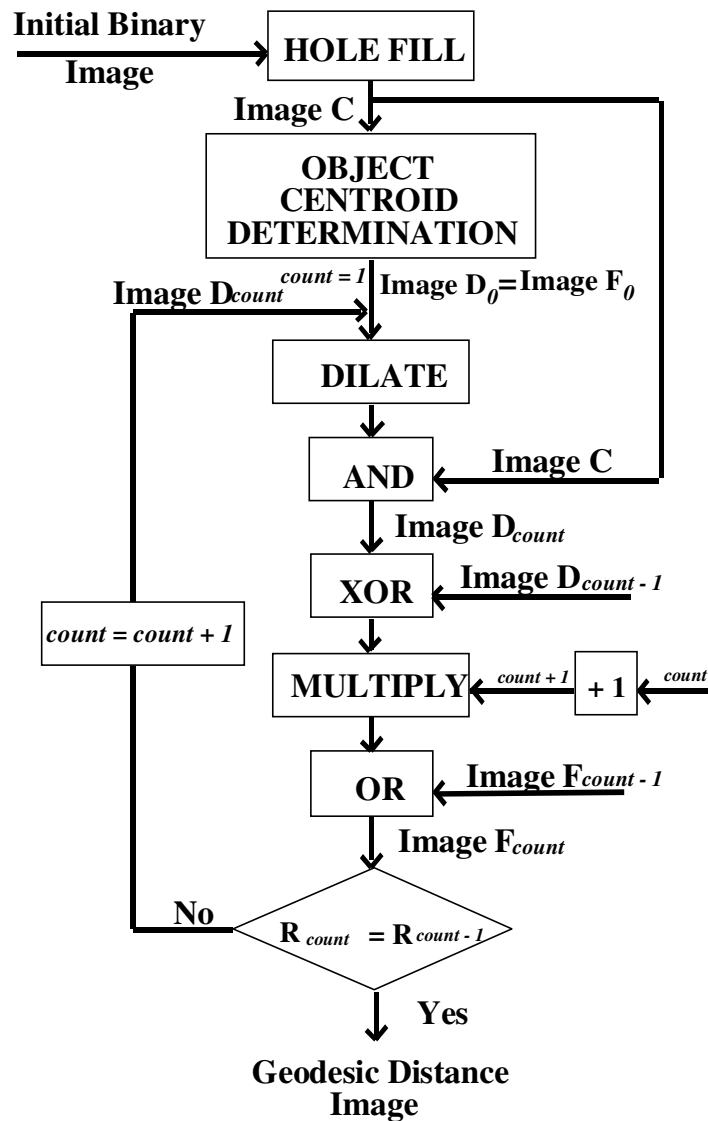


Figure 2. Flow chart of the algorithm used to determine geodesic length, iteratively combining logical and mathematical morphology operations on the binary image.

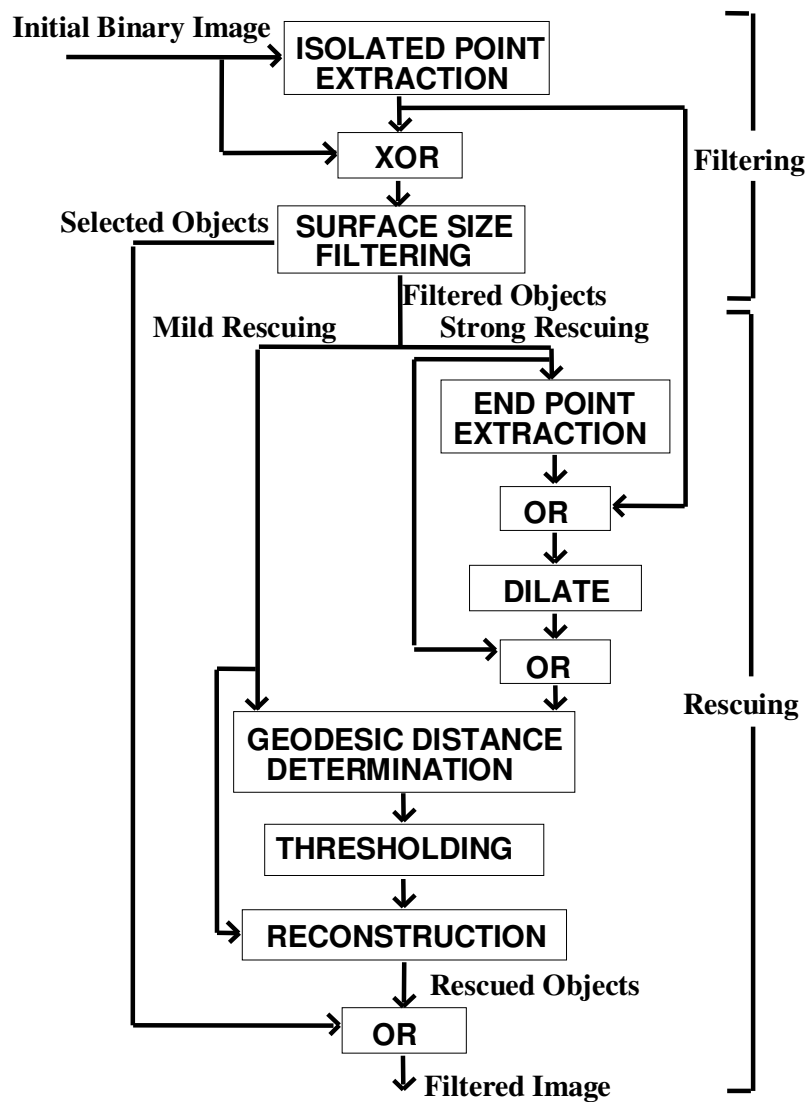


Figure 3. Flow chart of the algorithm implemented for the geodesic length (see text).

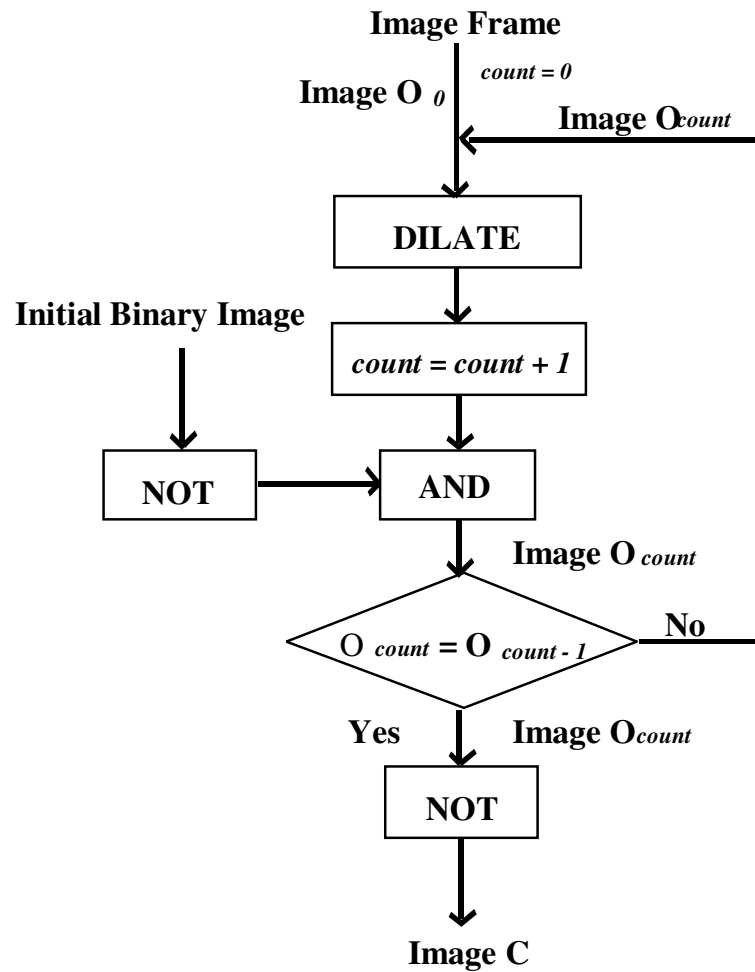


Figure 4. Flow chart of the hole-filling module. Hole-filling was obtained iteratively by using the negative of the negative image of the objects without holes according to the sequence “Dilation” and “And” applied to the image frame and negative of the initial image with holes.

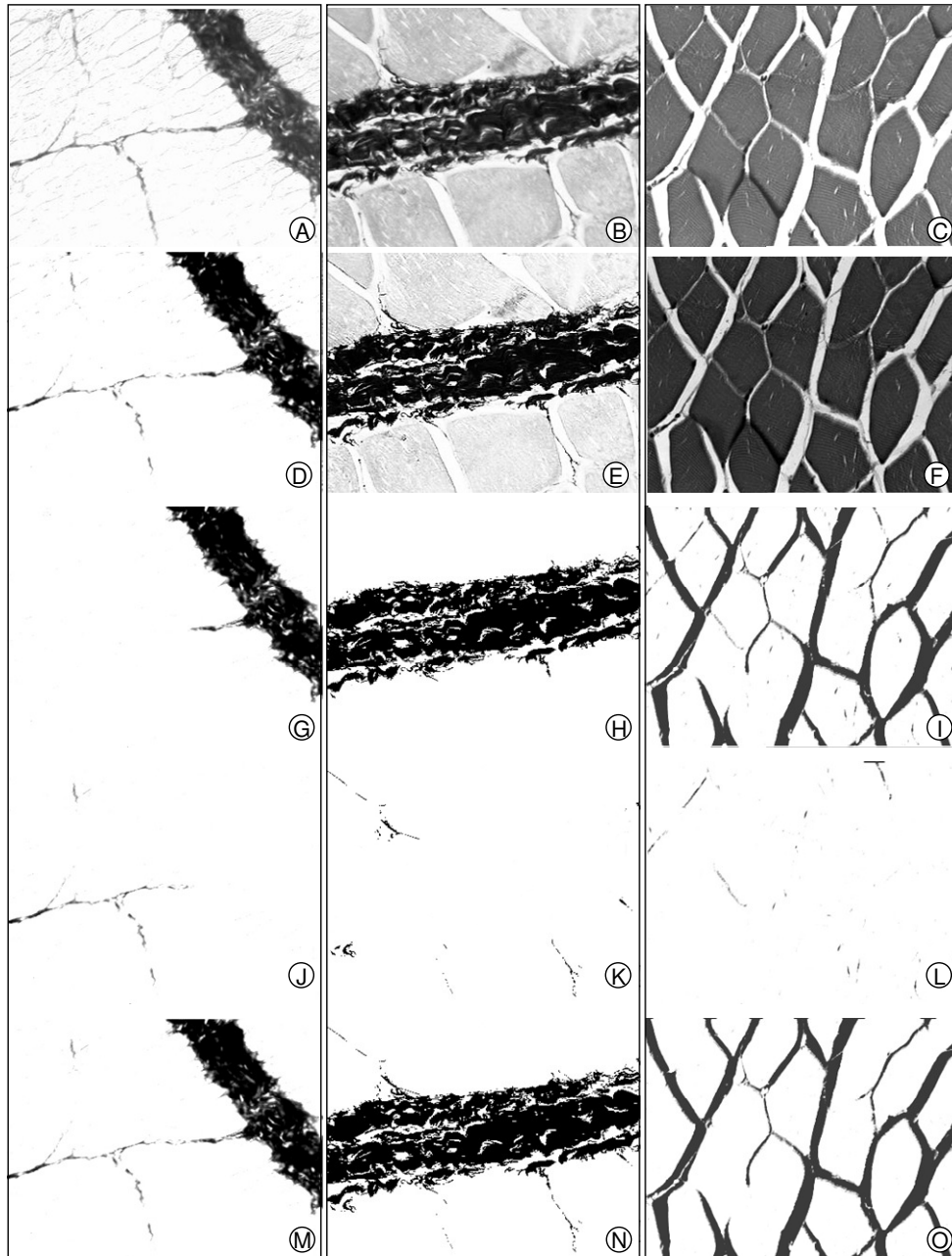


Figure 5. Phases of image analysis process. A: Digital image for quantification of IMCT of the meat (Sirius red 10x); B: Digital image for quantification of *perimysium* (Sirius red 20x); C: Digital image for quantification of muscle fibre retraction (hematoxylin-eosin 20x). D, E, F: Images normalized and improved using the computer application. G, H, I: Binary images; the area of interest is in black. J, K, L: Images resulting from the application of the filtering and reconstruction algorithms corresponding to elements extracted from connective

tissue areas in the thresholded image and added to images G, H, and I, respectively. M: Area of IMCT; N: Area of *perimysium*; O: Area of muscle fibre retraction to be quantified.

El capítulo II está basado en el artículo:

Using Near Infrared Spectroscopy in the Classification of White and Iberian Pork with Neural Networks

A. Guillén, F.G. del Moral, L.J. Herrera, G. Rubio, I. Rojas, J. González, & H. Pomares.

Enviado para publicación a **IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics**.

4.2. CAPÍTULO II

Using Near Infrared Spectroscopy in the Classification of White and Iberian Pork with Neural Networks

A. Guillén^a, F.G. del Moral^b, L.J. Herrera^a, G. Rubio^a, I. Rojas^a, J. González^a, & H. Pomares^a

^aDepartment of Computer Technology and Architecture, ETSI Informática, University of Granada, Spain.

^bDepartment of Pathology, School of Medicine, University of Granada, Spain.

Correspondence: A. Guillén, Department of Computer Technology and Architecture, ETSI Computer Science, University of Granada, 18071, Granada, Spain.

E-mail address: aguillen@atc.ugr.es

4.2.1. ABSTRACT.

The visible/near infrared spectra consist of overtones and combination bands of the fundamental molecular absorptions found in the visible and near infrared region. The analysis of the spectra might be difficult because overlapping vibrational bands may appear non-specific and poorly resolved. Nevertheless, the information it could be retrieved from the analysis of the spectra might be very useful for the food industry producers and for the consumers and food distributors because the meat could be classified based on the spectra in several aspects such as the quality, tenderness, kind of meat, etc. This paper applies Mutual Information theory and several classification models (Radial Basis Function Neural Networks and Support Vector Machines) in order to determine the breed of pork meat (iberian or white) using only as input the infrared spectra. First, the more relevant wavelengths from the spectra will be chosen, then, those wavelengths will be the input data to design the classifiers. As the experiments will show, the proposed techniques, when applied with a correct design methodology are capable of obtaining quality results for this concrete problem.

4.2.2. INTRODUCTION.

The visible/near infrared spectroscopy (VIS/NIRS) method relies on the spectrum-structure correlations existing between a measured spectral response caused by harmonics of the fundamental vibrations occurring at visible and infrared frequencies (400-2500 nm). These harmonic vibrations occur at unique frequencies depending upon the quantity of absorber (analyte), type of absorbing molecules present within the sample, and the sample thickness. VIS/NIRS is used where multicomponent molecular vibrational analysis is required in the presence of interfering substances. The VIS/NIR spectrum consists of overtones and combination bands of the fundamental molecular absorptions found in the visible and near infrared region. The generally overlapping vibrational bands may appear non-specific and poorly resolved, making a complex reflectance spectrum. Therefore, in some cases, it can be very difficult to associate specific characteristics to a determined set of chemical components. In order to solve this problem, this paper proposes the synergy of several techniques to perform a classification of the spectrum considering the

more representative wavelengths. The objective of the results is to examine the feasibility of VIS/NIRS to differentiate iberian pork meat from standard white pork meat and to evaluate the accuracy of prediction models.

One of the advantages of NIRS technology is not only to assess chemical structures through the analysis of the molecular bonds in the VIS/NIR spectrum, but also to build a characteristic spectrum that represents the "finger print" of the sample [5]. VIS-NIRS is therefore not a particularly sensitive technique, but it can be very useful in probing bulk material with little or no sample preparation. Within the electromagnetic spectrum, the infrared range can provide data about the composition of the piece both in the surface and in deeper layers since its penetration power is higher than the power that other lower frequencies have. However, the visible part of the spectrum is still quite important since the consumer might perform its shopping choice based on the amount of myoglobin, which pigments the meat.

The foodstuff industry is applying this technology because of the many benefits that it provides [17,19]: optical methods are nondestructive, fast, inexpensive, portable and are considered suitable for online measurements therefore they allow both, consumers and providers, to obtain information about the product they are buying or selling.

Several authors in the literature [15] agree in the need of developing new methodologies to trace the end product by identifying the presence and amount of different lower-priced meats and food authenticity and the detection of adulteration [5,14].

Within this framework, the work presented in this paper is aimed towards the objectives cited in the paragraph above, more concretely, the classification of meat pieces to be able to determine which breed they belong to: white pork or iberian pork. For this purpose, two well known classification tools will be compared: RBFNNs and SVM. However, the problem to be tackled does not only deals with the classification procedure but also with the determination of which wavelengths of the spectrum are more relevant for the classification. For this task, the MI criterion will be used. Hence, the paper is organized as follows: Section 2 describes how the MI concept can be applied to perform variable selection on the data obtained from the porks, and briefly describes the

classification models, afterwards, Section 4 shows the experimental results and in Section 5 conclusions are drawn.

4.2.3. DATA ANALYSIS AND CLASSIFICATION TECHNIQUES.

This section presents the different techniques used to analyze and classify the data obtained from the measurements. These are: Mutual Information (MI) concept to determine which areas of the spectrum are relevant to classify the data and Radial Basis Function Neural Networks (RBFNNs) and Support Vector Machines (SVMs) for the classification task.

4.2.3.1. Mutual Information.

The data representing each pork was compiled by concatenating four spectra: exterior and interior left cheek and interior and exterior right cheek. Each spectrum has 2151 values of reflectance so each pork is identified by a total of 8604 variables. In order to determine which of those reflectance values are significant to determine the breed of pork, mutual information (also called cross-entropy) will be employed. Let $X=\{x_k, k=1\dots n\}$ and $Y=\{y\}$ then, the mutual information between X and Y can be defined as the amount of information that the variables X provide about Y and vice versa, and can be expressed as:

$$I(X, Y) = H(Y) - H(Y|X). \quad (1)$$

where $H(Y)$ is the entropy of variable Y , that measures the uncertainty on Y . In the problem we are solving, X is a matrix where each row represents a pork and has 8604 columns. In the continuous case and according to the formulation of Shannon, it is defined as:

$$H(Y) = - \int \mu_Y(y) \log \mu_Y(y) dy, \quad (2)$$

where $\mu_Y(y)$ is the marginal density function, that can be defined using the joint Probability Density Function (PDF) $\mu_{X,Y}$ of X and Y as

$$\mu_Y(y) = \int \mu_{X,Y}(x,y)dx, \quad (3)$$

and $H(Y|X)$ is the conditional entropy, that measures the uncertainty of Y , given that X is known. It is defined in the continuous case as:

$$H(Y|X) = - \int \mu_X(x) \int \mu_Y(y|X = x) \log \mu_Y(y|X = x) dy dx. \quad (4)$$

In other words, mutual information $I(X, Y)$ is the decrease of the uncertainty on Y once we know X . Due to the entropy properties, mutual information can also be defined as:

$$I(X, Y) = H(X) + H(Y) - H(X|Y), \quad (5)$$

leading to

$$I(X, Y) = \int \mu_{X,Y}(x, y) \log \frac{\mu_{X,Y}(x, y)}{\mu_X(x)\mu_Y(y)} dx dy. \quad (6)$$

Thus, only the estimate of the joint Probability Density Function between X and Y is needed to estimate mutual information between two groups of variables.

Estimating the joint probability distribution can be performed using a number of techniques [3]. The estimator that will be used in this work is based on the k -nearest neighbors (k -nn) because it has some advantages over the ones based on histograms or on kernels and it has been shown to perform adequately [13]. This MI estimator (whose implementation is available at [1]) has a dependency on the value chosen for k (k -th nearest neighbor). As it is recommended in [11] for a tradeoff between variance and bias, in the examples, a mid-range value for k ($k = 6$) will be used.

Having the previously mentioned MI estimator, the determination of which reflectance values are significant to determine the breed of pork will be calculated by estimating the MI between every input variable x_i and the breed y (indicated using 0 and 1 values). More complex procedures can be designed using the MI in order to estimate the ranking of relevant input variables with respect to the output variables [12]. However, for this work there are too few data samples and this simple approach was selected.

4.2.3.2. Radial Basis Function Neural Networks.

4.2.3.2.1. Description.

Several types of Artificial Neural Networks (ANNs) can be defined by modifying the activation function of the number of layers. In [2] Broomhead and Lowe introduced the Radial Basis Function Neural Network model. This kind of ANN has been successfully applied to many problems related with nonlinear regression and classification [10, 6]. An RBFNN is a two-layer, fully connected network in which each neuron implements a gaussian function as follows:

$$\phi(\mathbf{x}; \mathbf{c}_i, r_i) = \exp\left(\frac{-\|\mathbf{c}_i - \mathbf{x}\|^2}{r_i^2}\right), i = 1, \dots, m \quad (7)$$

where \mathbf{x} is an input vector, \mathbf{c}_i is the center and r_i is the radius of i -th RBF.

The output layer implements a weighted sum of all the outputs from the hidden layer:

$$\mathcal{F}(\mathbf{x}; C, R, \Omega) = \sum_{i=1}^m \phi(\mathbf{x}; \mathbf{c}_i, r_i) \cdot \Omega_i \quad (8)$$

where Ω_i are the output weights, which modulates the contribution of a hidden layer to the corresponding output unit and can be obtained optimally by solving a linear equation system. The network architecture is depicted in Figure 1. Once the continuous output is obtained, the class corresponding to the input sample is computed by rounding the output of the function to its closest integer, this is, 0 for white pork or 1 for Iberian pork.

4.2.3.2.2. Design Methodology.

One of the methodologies to design an RBFNN to approximate a given function consists on a sequence of steps where the first one is the initialization of the RBF centers. This initialization task has been traditionally solved using clustering algorithms [9,8,18].

The algorithm that is used in the design is an adaptation of the one presented in [9] but modifying the way the input data is partitioned. As in classical clustering algorithms, the proposed algorithm defines a distortion function 9 that has to be minimized. The distortion function is based on a fuzzy-possibilistic approach as it was presented in [7], although the migration step has been simplified. The distortion function measures the possibilistic and fuzzy membership degrees combined with the weighted euclidean distance remaining as follows:

$$J_h(U, C, T, W; X) = \sum_{k=1}^n \sum_{i=1}^m (u_{ik}^{h_f} + t_{ik}^{h_p}) D_{ikW}^2 \quad (9)$$

restricted to the constraints:

$$\sum_{i=1}^m u_{ik} = 1 \quad \forall k = 1 \dots n \quad \text{and} \quad \sum_{k=1}^n t_{ik} = 1 \quad \forall i = 1 \dots m.$$

The final position of the centers is reached by an alternating optimization approach where all the elements defined in the function to be minimized are updated iteratively using the equations obtained by differentiating $J_h(U, T, C, W; X)$ (Equation 9) with respect to u_{ik} , t_{ik} , c_i and o_i .

4.2.3.3. Support Vector Machines.

Support Vector Machines (SVMs) [16] is directly related to the Statistical Learning Theory of Vapnik [16b], and were first introduced in Boser et al. (1992). SVMs is a kernel method that became popular after their success in a handwritten digit recognition problem, and has been receiving increasing

attention in the machine learning field. It is the state of the art in classification, and it also has an extension for regression problems.

Given a set of patterns with two classes, $\{(x_1, y_1), \dots, (x_N, y_N)\} \subset X \times \{\pm 1\}$, a Support Vector Machine Classifier searches for the optimal separating hyperplane $\langle w, x \rangle + b$ that maximizes the margin of separation between any training point and the hyperplane. In a hypothetical separable case, the decision boundary can be found by solving the following constrained optimization problem:

$$\begin{aligned} \min_{w \in X, b \in \mathbb{R}} J_P(w) &= \frac{1}{2} w^T w \\ \text{such that } y_k [w^T x_k + b] &\geq 1, \quad k = 1, \dots, N. \end{aligned} \quad (10)$$

In the case of non-separable patterns, misclassifications have to be tolerated and this is done by modifying the formulation, introducing slack variables ς_i .

$$\begin{aligned} \min_{w \in X, b, \varsigma_i \in \mathbb{R}} J_P(w) &= \frac{1}{2} \|w\|^2 + C \sum_{i=1}^N \varsigma_i \\ \text{such that } y_i (\langle w, x \rangle + b) &\geq 1 - \varsigma_i \text{ with } \varsigma_i \geq 0 \quad \forall i = 1, \dots, N. \end{aligned} \quad (11)$$

The constant $C > 0$ represents the trade-off between margin maximization and training error minimization. From these equations, a Lagrangian can be formulated, whose solution leads to the following dual Quadratic Programming problem:

$$\begin{aligned} \max_{\alpha} J_D(\alpha) &= -\frac{1}{2} \sum_{k,l=1}^N y_k y_l x_k^T x_l \alpha_k \alpha_l + \sum_{k=1}^N \alpha_k \\ \text{such that } \sum_{k=1}^N \alpha_k y_k &= 0 \\ 0 \leq \alpha_k &\leq C, \quad k = 1, \dots, N. \end{aligned} \quad (12)$$

So far, a large-margin classifier with a linear decision boundary has been considered. In order to generalize it to become nonlinear, the x_i is transformed into a higher dimensional space $\Phi(x_i)$ in order to find a linear decision boundary

in the space. The dot product in the previous equation would become $\Phi(x_k)^T \Phi(x_l) = k(x_k, x_l)$. A kernel k is a function that calculates the inner product in the feature space. Therefore by using kernels, the higher dimensional space mapping is not needed explicitly (kernel trick). The kernel function, being an inner product, can be seen as a similarity measure between the objects. Some typical kernel functions are:

$$\begin{aligned} k(x, x_k) &= x_k^T x \text{ (linear SVM)} \\ k(x, x_k) &= (\tau + x_k^T x)^d \text{ (polynomial SVM of degree } d) \\ k(x, x_k) &= \exp(-\|x - x_k\|_2^2 / \sigma^2) \text{ (RBF kernel)} \end{aligned} \quad (13)$$

In the previous QP formulation, the dot product is substituted by a function k and rewriting in terms of Lagrange multipliers:

$$\begin{aligned} \max_{\alpha} J_D(\alpha) &= -\frac{1}{2} \sum_{k,l=1}^N y_k y_l k(x_k, x_l) \alpha_k \alpha_l + \sum_{k=1}^N \alpha_k \\ \text{such that} \quad &\sum_{k=1}^N \alpha_k y_k = 0 \\ &0 \leq \alpha_k \leq C, \quad k = 1, \dots, N. \end{aligned} \quad (14)$$

Once solution for the previous problem is found, the decision function takes form:

$$f(x) = \text{sgn}\left(\sum_{i=1}^N y_i \alpha_i k(x, x_i) + b\right). \quad (15)$$

In which the parameter b is computed using the Karush-Kuhn-Tucker (KKT) conditions $\alpha_i [y_i(k(x, x_i) + b) - 1] = 0 \quad \forall i = 1, \dots, N$.

4.2.5. EXPERIMENTAL RESULTS AND DISCUSSION.

The wavelengths were obtained using a portable spectrophotometer FieldSpec® Pro JR of range 350-2500 nm. The spectrophotometer was

applied to the left and right masseter muscle on its veined and its lean sides, obtaining 4 measures for each pig. The amount of specimens was very reduced and only 15 from each breed were sacrificed, however, as the results will show, it seems quite possible to distinguish between those two kinds of pig breeds.

First, the algorithm to obtain the ranking of the more significant wavelengths was applied. Figure 2 shows the results. Then the classifiers were obtained by training the respective models using first the variable with the highest MI with respect to the output, then the two variables with the highest MI and so on. The X axis in the figure corresponds with the concatenation of the four spectra, this is, the lean side of the right *masseter*, then its veined side, then the lean side of the left *masseter* and finally, the veined side. As was cited before, each spectrum has 2051 wavelengths (the range 350-2500 nm) so, for example, the variable 3101 corresponds with the wavelength 1050 of the veined side of the right *masseter*. As Figure 2 shows the smallest wavelengths in the spectrum of the lean side of the right *masseter* present a high difference between the two breeds, opening another research line which is out of the scope of the paper but that shows how the techniques and models developed can be helpful in the study of other disciplines.

Due to the reduced number of samples (30), the classifiers were trained using all possible sets of data leaving always 2 samples for tests. This means that a total of 435 training sets of 28 samples were used. Table 1 shows the test results for both the RBFNNs and SVMs. The data in the columns are the total number of misclassifications made through the complete battery of training sets and the total percentage of correct classifications.

The RBFNNs generated with the FPCFA algorithm obtain the best results in comparison with the ones designed using the FCM and the SVMs. The reason that makes the FPCFA perform better than the FCM for any number of variables is the addition of the supervising parameter and the combination of two kinds of partitions: possibilistic and fuzzy. The RBFNNs get their maximum classification performance using a variable and if the number of variable is increased, they perform well but not as much as with less variables. When introducing other variables, we are adding more information but, at the same time, the solution space is increased exponentially, therefore, since the RBFNNs are local models, they perform better in small dimensions. SVMs have an exceptional

performance as well. The SVMs used for the experiments were obtained using the implementation in [4] have a gaussian kernel with $\gamma = 1$ and the constant $C=30$ in order to highly penalize the misclassifications.

4.2.6. CONCLUSIONS.

This paper has presented the combination of several techniques in order to be able to classify different breeds of pig with the objective of applying it to the food industry. As the results showed, the techniques combined, are able to classify with a large accuracy the specimens used for the experiments. The paper shows how the MI is capable of reducing the dimensionality of the problem without losing important information by the time of classifying. Both RBFNNs and SVMs, when designed with specific algorithms, are able to classify very accurately the given samples.

4.2.7. ACKNOWLEDGEMENTS.

This work has been partially supported by the Spanish CICYT Project TIN2004-01419

4.2.8. REFERENCES.

- [1] <http://www.klab.caltech.edu/~kraskov/MILCA/>.
- [2] D. S. Broomhead and D. Lowe. Multivariate functional interpolation and adaptive networks. *Complex Systems*, 2:321-355, 1988.
- [3] B.V. Bonnländer and A.S. Weigend. Selecting input variables using mutual information and nonparametric density estimation. In *Proc. of the ISANN*, Taiwan, 2004.
- [4] C. Chih-Chung and L. Chih-Jen. *LIBSVM : a library for support vector machines*. <http://www.csie.ntu.edu.tw/~cjlin/libsvm>, 2001.
- [5] D. Cozzolino and I. Murray. Identification of animal meat muscles by visible and near infrared reflectance spectroscopy. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 37:447-452, 2004.
- [6] A. Guillén, I. Rojas, J. González, H. Pomares, L. J. Herrera, and F. Fernández. Multiobjective RBFNNs Designer for Function Approximation: An Application for Mineral Reduction. *Lecture Notes in Computer Science*, 4221:511-520, 2006.
- [7] A. Guillén, I. Rojas, J. González, H. Pomares, L. J. Herrera, and A. Prieto. A Fuzzy-Possibilistic Fuzzy Ruled Clustering Algorithm for RBFNNs Design. *Lecture Notes in Computer Science*, 4259:647-656, 2006.
- [8] A. Guillén, I. Rojas, J. González, H. Pomares, L.J. Herrera, O. Valenzuela, and A. Prieto. A Possibilistic Approach to RBFN Centers Initialization. *Lecture Notes in Computer Science*, 3642:174-183, 2005.
- [9] A. Guillén, I. Rojas, J. González, H. Pomares, L.J. Herrera, O. Valenzuela, and A. Prieto. Improving Clustering Technique for Functional

Approximation Problem Using Fuzzy Logic: ICFA algorithm. *Lecture Notes in Computer Science*, 3512:272-280, June 2005.

- [10] A. Guillén, I. Rojas, E. Ros, and L.J. Herrera. Using Fuzzy Clustering Technique for Function Approximation to Approximate ECG Signals. *Lecture Notes in Computer Science*, 3562:538-547, June 2005.
- [11] S. Harald, K. Alexander, A.A. Sergey, and G. Peter. Least dependent component analysis based on mutual information. *Physics Review*, December 2004.
- [12] L.J. Herrera, H. Pomares, I. Rojas, M. Verleysen, and A. Guillen. Effective Input Variable Selection for Function Approximation. *Lecture Notes in Computer Science*, 4131:41-50, 2006.
- [13] A. Kraskov, H. Stögbauer, and P. Grassberger. Estimating mutual information. *Physics Review*, June 2004.
- [14] V. Ortiz-Somovilla, F. España-España, A.J. Gaitán-Jurado, J. Pérez-Aparicio, and E.J. De Pedro-Sanz. Proximate analysis of homogenized and minced mass of pork sausages by NIRS. *Food Chemistry*, 101:1031-1040, 2007.
- [15] V. Ortiz-Somovilla, F. España-España, E.J. De Pedro-Sanz, and A.J. Gaitán-Jurado. Meat mixture detection in Iberian pork sausages. *Meat Science*, 71:490-497, 2005.
- [16] B. Scholkopf and A. Smola. *Learning with Kernels*. MIT Press, Cambridge, 2002.
- [16b] V. Vapnik. *The Nature of Statistical Learning Theory*. 2nd edition, Springer, 1999.

- [16c] B.E. Boser et al. A Training Algorithm for Optimal Margin Classifiers. *Proceedings of the Fifth Annual Workshop on Computational Learning Theory* 5 144-152, Pittsburgh, 1992.
- [17] H.J. Swatland. Physical measurements of meat quality: optical measurements, pros and cons. *Meat Science*, 36:251-259, 1994.
- [18] Z. Uykan, C. Güzelis, M. E. Celebei, and H. N. Koivo. Analysis of Input-Output Clustering for Determining Centers of RBFN. *IEEE Transactions on Neural Networks*, 11(4):851-858, July 2000.
- [19] J.J. Xia, E.P. Berg, J.W. Lee, and G. Yao. Characterizing beef muscles with optical scattering and absorption coefficients in VIS-NIR region. *Meat Science*, 75:78-83, 2007.

Figure 1. 6. A Radial Basis Function Neural Network

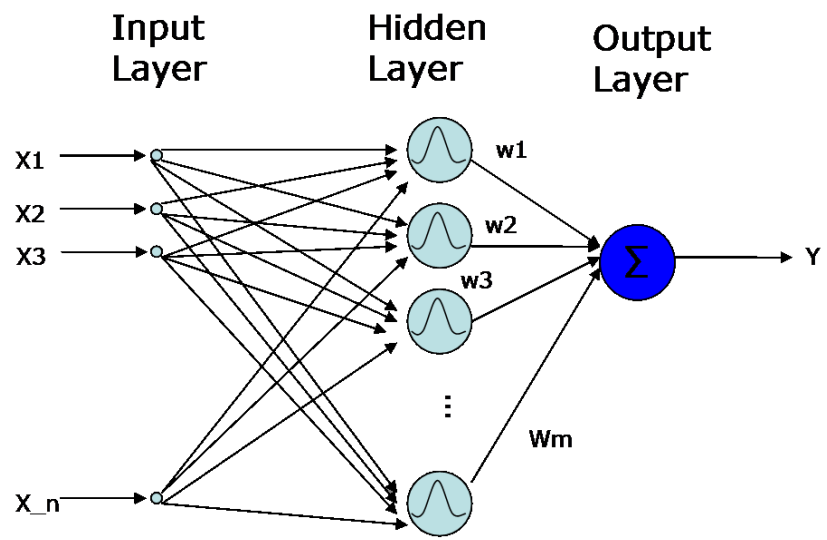


Figure 2. 7. Ranking of variables for the set of samples by Mutual Information. Variables 1-2151: lean side of the right *masseter*; variables 2152-4302: marbled side of the right *masseter*; variables 4303-6453: lean side of the left *masseter*; variables 6454-8604: marbled side of the left *masseter*.

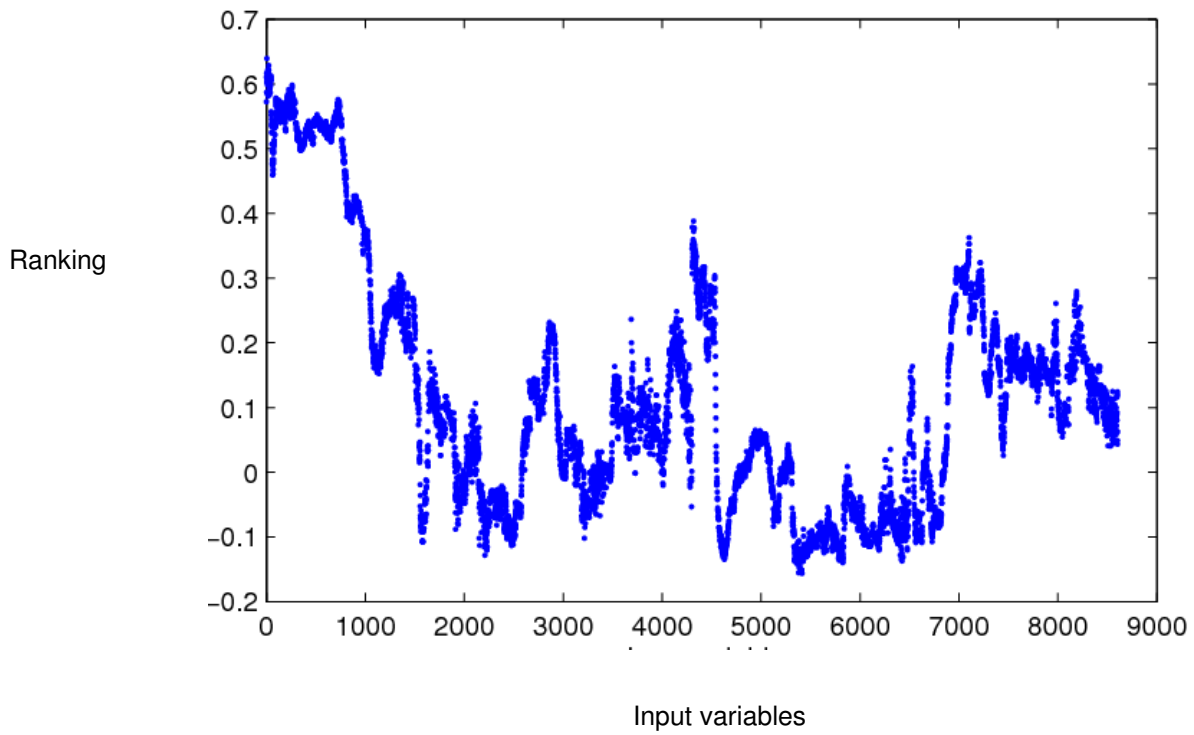


Table 1.2. Misclassifications and percentage of successful classifications for the different algorithms using different numbers of variables

# Variables	RBNN using FCM SVM	RBNN using FPCA
1	15 - 97.851%	8 - 98.885% 2 - 99.770%
2	9 - 98.655%	3 - 99.610% 2 - 99.770%
3	6 - 99.310%	2 - 99.770% 3 - 99.610%

El capítulo III está basado en el artículo:

Duroc and Iberian Pork Neural Network Classification by Visible and Near Infrared Reflectance Spectroscopy.

F.G. del Moral, A. Guillén, L.G. del Moral, F. O'Valle, L. Martínez, & R.G. del Moral.

Enviado para publicación a **Journal of Food Engineering**.

4.3. CAPÍTULO III

Duroc and Iberian Pork Neural Network Classification by Visible and Near Infrared Reflectance Spectroscopy

F.G. del Moral^a, A. Guillén^b, L.G. del Moral^c, F. O'Valle^a, L. Martínez^d, & R.G. del Moral^a.

^a Department of Pathology, School of Medicine, University of Granada, Spain.

^b Department of Computer Technology and Architecture, ETSI Computer Science, University of Granada, Granada, Spain.

^c Department of Vegetal Physiology, School of Science, University of Granada, Spain.

^d Department of Chemical Engineering, School of Science, University of Granada, Spain.

Correspondence:

Raimundo G. del Moral, MD, PhD.

Dpto. de Anatomía Patológica,

Facultad de Medicina,

18012 Granada, Spain.

Tel: + 34-958-24-35-09.

Fax: + 34-958-24-35-10

E-mail: rgarcia@ugr.es

4.3.1. ABSTRACT.

Visible and near infrared reflectance spectroscopy (VIS/NIRS) was used to classify between white and Iberian pork in the *M. masseter*. Samples of white (n = 15) and Iberian (n = 15) pig muscles were scanned in the VIS/NIR region (359-2500 nm) using a portable spectral radiometer. Both Mutual Information and VIS/NIRS Spectra Characterization were developed to generate a ranking of variables and the data were then processed by Artificial Neural Networks, establishing 1, 3, or 10 wavelengths as input variable for the classification between the two pig breeds. The models correctly classified >70% of all problem assumptions, with a correct classification of >95% for the three-variable assumption, both in the Mutual Information Ranking and VIS/NIRS Spectra Characterization. These results demonstrate the potential of the VIS/NIRS technique as an objective and rapid method for the authentication and identification of white and Iberian pork.

KEYWORDS: Iberian pork, white pork, Mutual Information, Neural Network, spectra characterization, VIS/NIRS.

4.3.2. INTRODUCTION

Iberian pig (*Sus mediterraneus*) is a rustic breed from the Southeast of the Iberian Peninsular with a high adipogenic potential. These animals are reared naturally in *La Dehesa*, a natural ecosystem largely comprising cork trees, holme oaks, and gall-oaks, and undergo a final fattening phase based on the consumption of natural resources, mainly acorns, in extensive acorn-rich pasture lands, called *montanera* in Spanish. In the past, the economic yield from this breed was low, but a recent high demand for Iberian dry-cured products led to an increase in the Iberian pig census to one million pigs in 2004 (MAPA, 2004). Iberian breed has traditionally been crossed with Duroc pigs to obtain more piglets per sow and a higher weight at weaning and at the end of fattening (Ramírez & Cava, 2007). Cross-bred Iberian-Duroc pigs have more lean meat, less fat and higher growth rates versus pure Iberian pigs. Since 2001, Spanish legislation (BOE 15th October, 2001) has only permitted Iberian X Duroc crosses when the maternal line is pure Iberian, in order to preserve the purity of the Iberian breed.

Ramírez et al. (2007) concluded that the crossing of Duroc genotypes selected for meat production with Iberian pigs significantly reduced the quality of Iberian products, resulting in less marbling and lower intramuscular fat contents, less intensity of color and odor, poor texture characteristics, higher polyunsaturated fatty acids content, more susceptibility to rancidity and a saltier taste. They proposed that Duroc lines crossed with Iberian pigs required characterization to avoid losses in the quality of Iberian products.

With respect to characterization, visible and near infrared spectroscopy (VIS/NIRS) has become established over the past 30 yrs as a rapid and effective method to assess the quality of meat products. A major challenge faced by the industry is the determination of the authenticity and purity of its products with the possibility of integrating this assessment into an analytical system of surveillance for certified meat products by rapid screening techniques (Hoving-Bolink, Vedder, Merks, de Klein, Reimert, Frankhuizen, van der Broek, & Lambooi, 2005; Savenije, Geesink, van der Palen & Hemke, 2006). Consumers demand accurate and fast quality control in the different phases of the manufacturing process, and VIS/NIRS has emerged as an appropriate tool for quality assurance because optical methods are non-destructive, fast,

inexpensive, portable and are considered suitable for online measurements, providing both consumers and suppliers with information about the product they are buying or selling (Swatland, 1994; Xia, Berg, Lee, & Yao, 2007).

According to the literature VIS/NIRS technology has been used in pork to determine intramuscular fat (Hoving-Bolink et al., 2005; Savenije et al., 2006), fatty acid composition (Fernández-Cabanás, Garrido-Varo, García Olmo, De Pedro, & Dardenne, 2006; González-Martín, González-Pérez, Álvarez-García, & González-Cabrera, 2005; González-Martín, I., González-Pérez, C., Hernández-Méndez, J., & Álvarez-García, N., 2003), color (Cozzolino, Barlocco, Vadell, Ballesteros, & Gallieta, 2003), water-holding capacity (Brøndum, Munk, Henckel, Karlsson, Tornberg, & Engelsen, 2000) and presence of RN⁻ genetic allele (Josell, Martinsson, Borggaard, Andersen & Tornberg, 2000) but it has not been applied for direct qualitative classification of meats of varied quality and price (i.e., gastronomic value). Novel methodologies are required for the traceability of meats, establishing their authenticity and detecting adulteration (Cozzolino & Murray, 2004; Ortiz-Somovilla, España-España, De Pedro-Sanz, & Gaitán-Jurado, 2005; Ortiz-Somovilla, España-España, Gaitán-Jurado, Pérez-Aparicio, & De Pedro-Sanz, 2007).

The objective of this study was to examine the feasibility of VIS/NIRS to differentiate Iberian pork from standard white pork in fresh meat and to evaluate the accuracy of prediction models, comparing Neural Network based on Mutual Information Ranking with classical models based on the VIS/NIRS spectrum. This paper proposes a synergy of NIRS and neural networks for the classification of spectra and to develop a “finger-print” for Iberian and Iberian X Duroc pork.

4.3.3. MATERIAL AND METHODS.

4.3.3.1. Experimental design.

Thirty animals were slaughtered at a commercial slaughter plant: one group of 15 crossbreed white pigs and another of 15 Iberian pigs. At slaughter, the white pigs had mean age of 6 months and mean carcass weight of 85 kg, whereas the Iberian pigs had mean age of 12-14 months and mean carcass weight of 125 kg. After exsanguination, 2-hr hygienic-health analysis of carcasses was performed in a refrigeration chamber a 4^o C, followed by hot

deboning and extirpation of the right-hand side of *M. masseter*. The muscle was vacuum-packed and preserved in refrigerated chamber at 4°C for 72 hrs, thereby simulating the mean transport time from the slaughterhouse to the supermarkets for sale to the final consumer. Three hours before quantifications were performed, the vacuum bag was opened to allow oxygenation of the meat and avoid interferences due to oxidation state of the myoglobin.

4.3.3.2. Macroscopic description of *M. masseter*.

M. masseter presents some specific histological characteristics, with a major development of Intramuscular Connective Tissue (IMCT), especially of the perimysium, due to the high tension it must endure. The outer fascia is lean, with little surface marbling. Its macroscopic histology is highly homogeneous, with a large predominance of striated muscle fibers. In contrast, the inner fascia delimiting the oral cavity shows major marbling with macroscopically visible strips of IMCT several millimeters wide. For consistency, the outer side of the muscle is designated the lean side and the inner side the marbled side.

4.3.3.3. VIS/NIRS measurements.

4.3.3.3.1. Spectrometer.

The reflectance spectrum of *M. masseter* was acquired using a portable spectral radiometer (FieldSpec® Pro JR A 110080; Analytical Spectral Devices Inc., Boulder, CO) with a reflectance range of 350-2500 nm. The sampling interval was 1.4 nm for the spectral range 350 to 1000 nm and 2 nm for the range 1000 – 2500 nm. The system also incorporated a contact probe (FieldSpec Pro FR A111208; Analytical Spectral Devices Inc.) with halogenous light source and measurement surface area equivalent to a circle 2 cm in diameter, and a maximum specular reflectance of 5%.

4.3.3.3.2. Spectra.

White level was calibrated on a Spectralon of 3.62" diameter (Analytical Spectral Devices Inc.). Material with approximately 100% reflectance across the entire spectrum is designated a white reference panel or white reference standard.

The spectrum was optimized by adjusting sensitivity to varying conditions of illumination with software-adjustable integration time, which determines how long the array will collect energy in the 350 -1050 nm region, and uses automatically adjusted gains in the 1000 – 2500 nm region to amplify the signal. A Dark Current Correction (DCC) was applied to remove electrical current generated by thermal electrons (called dark current), and is added to that generated by incoming photons. The raw data returned are 16-bit numbers corresponding to the output of each element in the VIS/NIRS detector array and each 2 nm sample of the spectrum to generate a relative reflectance (the reflectance factor), which is the quantity that the system measures. The system reduces noise in the desired spectral signal by Spectrum Averaging technique (average of 20 spectrums per quantification).

Two spectra were acquired for each animal at 72 h *post-mortem*, directly applying the contact probe on both the lean side and marbled side of the *M. masseter*.

4.3.4. Data analysis.

The data analysis had two main objectives: 1) to establish a ranking of wavelengths, using Mutual Information Ranking (MI), to identify relevant areas of the spectra for the data classification; 2) to use this ranking to classify the data by means of Radial Basis Function Neural Networks (RBFNNs).

4.3.4.1. Mutual Information Ranking.

Mutual information (MI) theory (cross-entropy) was applied to determine the most representative wavelengths in the differentiation between white and Iberian pork and to characterize the spectra. Given the two variables $X = \{x_k, k = 1..n\}$ and $Y = \{y_k, k = 1..n\}$, the mutual information between X and Y can be defined as the amount of information that the variables X provide about Y and vice-versa, and can be expressed as:

$$I(X | Y) = H(Y) - H(Y | X)$$

where $H(Y)$ is the entropy of variable Y , which measures the uncertainty on Y . In the continuous case and according to the formulation of Shannon, it is defined as:

$$H(Y) = -\int \mu_Y(y) \log \mu_Y(y) dy,$$

where $\mu_Y(y)$ is the marginal density function, which can be defined using the joint Probability Density Function (PDF) $\mu_{X,Y}$ of X and Y as

$$\mu_Y(y) = \int \mu_{X,Y}(x, y) dx,$$

and $H(Y|X)$ is the conditional entropy, which measures the uncertainty of Y , since X is known. It is defined in the continuous case as:

$$-\int \mu_X(x) \int \mu_Y(y|X=x) \log \mu_Y(y|X=x) dy dx.$$

In other words, mutual information $I(X, Y)$ is the decrease in uncertainty on Y once X is known. Due to entropy properties, mutual information can also be defined as:

$$I(X, Y) = H(X) + H(Y) - H(X|Y),$$

leading to:

$$I(X, Y) = \int \mu_{X,Y}(x, y) \log \frac{\mu_{X,Y}(x, y)}{\mu_X(x) \mu_Y(y)} dx dy.$$

Hence, only the estimate of the joint PDF between X and Y is needed to estimate mutual information between two groups of variables.

Estimating the joint probability distribution can be performed using a number of techniques (Bonnländer & Weigend, 2004; Herrera, Pomares, Rojas, Verleysen & Guillén, 2006). The estimator used in the present study is based on k-nearest neighbors (k-nn) because it has some advantages over estimators based on histograms or kernels and has been shown to perform adequately (Kraskov, Stögbauer & Grassberger, 2004). This MI estimator (Astakhov, Grassberger, Kraskov, & Stögbauer, internet resource) is dependent on the value chosen for k (k-th nearest-neighbor). As recommended by Stögbauer, Kraskov, Astakhov, & Grassberger (2004), A is used for a trade-off between variance and bias, with a mid-range value for k (k = 6).

4.3.4.2. Radial Basis Function Neural Networks (RBFNN).

An RBFNN is a two-layer, fully connected network in which each neuron implements a Gaussian function as follows:

$$e^{-\frac{\|\bar{x}_k - \bar{c}_i\|^2}{r_i^2}}$$

where \bar{x}_k is an input vector, \bar{c}_i is a center of the i th RBF and r_i^2 is the radius of the i th RBF.

The output layer implements a weighted sum of all the outputs from the hidden layer:

$$F(\bar{x}_k; C, R, \Omega) = \sum_{i=1}^m \Phi(\bar{x}_k; \bar{c}_i, r_i) \cdot w_i$$

where $\Omega = \{w_1, \dots, w_m\}$ are the output weights, which modulate the contribution of a hidden layer to the corresponding output unit and can be obtained optimally by solving a linear equation system. The network architecture is depicted in Figure 1. Once the continuous output is obtained, the class corresponding to the input sample is computed by rounding the output of the function to its closest integer, i.e., 0 for white pork and 1 for Iberian pork.

This kind of neural network has been applied successfully to a wide variety of problems, including function approximation and classification tasks (Guillén, Rojas, González, Pomares, Herrera, & Fernández, 2006; Guillén, Rojas, Ros, & Herrera, 2005). Although in the present case the output is discrete, with only two types of pigs, an approximator can be used to obtain a continuous output because Iberian pigs can be crossed with other breeds (not pure), and a threshold could be established from a continuous output to offer a more specific classification of the Iberian breed.

One methodology to design an RBFNN consists of a sequence of steps, starting with initialization of the RBF centers. This initialization task has traditionally been solved using clustering algorithms (Guillén, Rojas, González, Pomares, Herrera, Valenzuela, & Prieto, 2005; Guillén, Rojas, González, Pomares, Herrera, Valenzuela, & Prieto, 2005; Uykan, Güzelis, Celebei, & Koivo, 2000). The algorithm used in the design of the RBFNNs to classify the different breeds of pig is an adaptation of the algorithm published by Guillén, Rojas, González, Pomares, Herrera, & Prieto (2006), in which a fuzzy partition

was replaced with a possibilistic-fuzzy partition. This algorithm was used in order to offer a supervised learning in which the output values are considered at the time when centers are placed in one or other positions, allowing identification of a specific class to be prioritized and gaining greater sensitivity and specificity.

In order to place the centers of RFBs in the input space, a distortion function is defined, which must be minimized to establish a balance between the positions of the centers and the membership degree of the output vectors. This function is defined as:

$$J_{hf, hp}(U, C, T, O; X) = \sum_{k=1}^n \sum_{i=1}^m (u_{ik}^{(hf)} + t_{ik}^{(hp)}) D_{ikW}^2$$

restricted to the constraints:

$$\sum_{i=1}^m u_{ik} = 1, \quad k = 1, \dots, n$$

$$\sum_{k=1}^n t_{ik} = 1, \quad i = 1, \dots, m$$

where u_{ik} is the fuzzy membership degree, t_{ik} is the possibilistic membership degree, D_{ikW} is the weighted Euclidean distance from the center \vec{c}_i to the vector \vec{x}_k , and hf and hp are two values to control how fuzzy and possibilistic the partition is.

The Euclidean distance is weighted by defining a hypothetic value for the output axis that assigns an output value o_i to each center. Thus, the weighted Euclidean distance is computed as follows:

$$D_{ikW} = \|\vec{x}_k - \vec{c}_i\| \cdot |y_k - o_i|$$

The final position of the centers is reached by an alternating optimization approach where all elements defined in the function to be minimized are updated iteratively using the equations obtained by differentiating $J_h(U, T, C, O; X)$ with respect to u_{ik} , t_{ik} , \vec{c}_i and o_i these are:

$$u_{ik} = \left(\sum_{j=1}^m \left(\frac{D_{ik}}{D_{jk}} \right)^{\frac{2}{hf-1}} \right)^{-1} \quad t_{ik} = \left(\sum_{j=1}^n \left(\frac{D_{ik}}{D_{ij}} \right)^{\frac{2}{hp-1}} \right)^{-1}$$

$$\vec{c}_i = \frac{\sum_{k=1}^n (u_{ik}^{hf} + t_{ik}^{hp}) \vec{x}_k}{\sum_{k=1}^n (u_{ik}^{hf} + t_{ik}^{hp})} \quad o_i = \frac{\sum_{k=1}^n (u_{ik}^{hf} + t_{ik}^{hp}) y_k d_{ik}^2}{\sum_{k=1}^n (u_{ik}^{hf} + t_{ik}^{hp}) d_{ik}^2}$$

The algorithm continues iterating until the value of the centers does not significantly change. Once the centers have been initialized, the heuristic of the nearest neighboring Ks is used to calculate the radii [knn] and a local search algorithm is applied to make a better fit of the centers and radii.

4.3.5. RESULTS AND DISCUSSION.

4.3.5.1. Results of macroscopic observations

Macroscopic observations of the M. *masseter* muscle revealed a high number of structured streaks of fat alongside IMCT on the marbled side. This complicates the spectral reflectance measurement, which is influenced by the area on which the VIS/NIRS probe is placed. The streaks can be almost 1-cm thick, hence the reflectance spectrum acquired can be affected by sampling error.

In contrast, macroscopic observation of the lean side of M. *masseter* showed high histological homogeneity, with absence of large streaks of IMCT and fat, revealing a very homogeneous tissue due to the predominance of muscle fibers.

As detailed below, spectral reflectance results obtained on the lean side were more relevant to the classification between white and Iberian pork compared with results obtained on the marbled side.

4.3.5.2. Mutual Information Ranking.

The ranking (see Fig. 2) derived from the Mutual Information Ranking (MI Ranking) included 4302 variables for each muscle (2151 wavelengths/spectrum on each side), from which the 1000 wavelengths of greatest importance were selected. Out of these 1000 variables, 951 corresponded to the lean side of M. *masseter* and the remaining 49 wavelengths to the marbled side, with considerably more MI on the lean than on marbled side. These 1000 variables were correlated with the ten peaks observed after transforming reflectance

spectra into absorbance (Absorbance = $\text{Log } 1/\text{Reflectance}$), obtaining 10 wavelengths related to these peaks and presenting the highest MI ranking (Table 1).

Fernández-Cabanás et al. (2006) reported that NIR spectra of pork fats are characterized by sharp peaks susceptible to changes caused by unexpected variations, concluding that optimization of the derivatives used is therefore essential to implement robust calibrations for quantitative classifications. In our model, we did not use VIS/NIRS for quantification of the muscle characteristics but rather for qualitative classification of the samples, in line with the model proposed by Cen & He (2007) for pattern recognition by Artificial Neural Networks (ANN). To avoid interference with the analysis capacity of the algorithm and any loss of spectrum information, the MI Ranking was obtained from raw spectrum data with no treatment or mathematical transformation.

4.3.5.3. VIS/NIR spectral characterization (VIS/NIR SC).

Figures 3 and 4 depict mean values of all raw reflectance spectra for the white and Iberian pork and the corresponding absorbance values. Reflectance measurements show a clear dominance of the pigments of fresh meat, since muscle fibers, myofibrils, intramuscular fat patches collagen, protein coagulation surfaces, and moisture cause light scattering (Cozzolino et al., 2003). Only whole muscles were examined in the present study, i.e., with no mincing of samples. As reported by Cozzolino et al. (2003), the structure of muscle appears to influence the way in which light is trapped or scattered and probably interferes with the results. However, this was not sufficient reason for the mincing of samples for their quantification, which is highly incompatible with rapid on-line working, except when the preparation is in the form of pork sausages or similar products (Ortíz-Somovilla et al., 2005; Ortiz-Somovilla et al., 2007).

Whereas raw reflectance spectrum data were used for the MI computer analysis, absorbance data were used to characterize the spectra, because they are easier to visualize and are more widely reported in the literature. Figure 4 depicts the mean VIS/NIR spectra of absorbance in *M. masseter* of white and Iberian pork. Qualitatively, based on our review of the literature, we were able to

observe in the visible region an absorption band at 415 nm associated with the Soret Band, which is due to erythrocyte hemoglobin traces (Brøndum et al., 2000; Cozzolino et al., 2003; Cozzolino et al., 2004), and adsorption bands at 545 and 577 nm related to muscle pigments, specifically to different hemoglobin oxidation states (Brøndum et al., 2000; Cozzolino et al., 2003, Cozzolino et al., 2004; Ortiz-Somovilla et al., 2005; Ortiz-Somovilla et al., 2007). According to Shackelford, Wheeler & Koohmaraie (2004), the ratio of reflectance at 610 and 525 nm in beef was an indicator of the percentage of myoglobin in an oxymyoglobin state. Their variance component analysis showed that less than half of the total variance was attributable to the carcass at 606 nm because of the large effect of bloom time on reflectance at this frequency. The authors concluded bloom time would have to be standardized if VIS/NIRS spectroscopy were to be successfully used to predict meat quality. The slaughtering process was fully standardized in the slaughterhouse used in the present study, and the pigs were exsanguinated immediately after their slaughter.

Shackelford et al. (2004) detected a reflectance peak at 804 nm in lamb *M. longissimus dorsi et lumborum* samples using a high-intensity reflectance probe. We used a similar probe from the same company (Analytical Spectral Devices, Inc.) obtaining a reflectance peak of 795-804 nm in both white and Iberian pork. Although the above authors reported that reflectance was not affected by bloom at 804 nm, we were unable to relate this wavelength to any characteristic of the meat.

At 980 nm, we found a new absorbance peak, attributed by Ortiz-Somovilla et al. (2007) to the transition of the spectrum from the invisible to near-infrared zone. This peak is due to OH bond second overtone, which is in turn correlated with absorbance at 1450 nm (OH bond second overtone), both due to water (Brøndum et al., 2000; Cozzolino et al., 2003; Hoving-Bolink et al., 2005; Ortiz-Somovilla et al., 2005; Ortíz-Somovilla et al., 2007). An absorption band at 1725 nm was related to CH₂ first overtone (Cozzolino et al., 2004) and 1930 nm to OH overtone combinations (water). For fat content and fatty acid molecule, in which a CH bond is essential, researchers have obtained bands at around 1200, 1400, 1750, 2310 and 2340 nm. Various authors (Cozzolino et al., 2004; Hoving-Bolink et al., 2005; Ortiz-Somovilla et al., 2005; Ortiz-Somovilla et al., 2007;) reported maximum absorbance at 1215 and 1210 nm (CH stretch

second overtone), confirming that significant information on fat and intramuscular fat is found at around 1200 nm, as at 1210 nm in the present study. At 2310 nm, CH combinations associated with fat content and fatty acids are observed (Cozzolino et al., 2003; Cozzolino et al., 2004).

Above 1800 nm, the crossing of VIS/NIR SC information with MI Ranking data showed that the marbled side was more important, although with a lower amount of MI. The presence of fat on the marbled side of *M. masseter* is evident and more detailed study of these wavelengths is required.

4.3.5.4. Breed classification by Neural Network: Mutual Information Ranking vs. VIS/NIRS Spectra Characterization.

Table 2 shows the comparison between the most relevant wavelengths according to the MI Ranking (set A) and the VIS/NIR SC (set B) obtained from our spectra and the literature. The comparison for breed classification was performed by Neural Network, carrying out tests using different sizes for the sets of training/test cases of the algorithm (29/1, 28/2, 27/3, 25/5, 26/4 and 20/10). A cross-validation was performed for each of these values. For all these training/test sets, alternative iterations were performed between white and Iberian pigs. Thus, for set 27/3, 2 white pigs and 1 Iberian pig were iterated in the first iteration, 2 Iberian pigs and 1 white pig in the second iteration, and so on. In order to be as equitable as possible and to maintain a balance between classes of samples in the sets, the data were previously randomly assigned such that sample \bar{x}_i was a different class from samples \bar{x}_{i-1} y \bar{x}_{i+1} .

Table 2 lists the results of the classifications made by the different RBFNNs developed using the above-described algorithm. The table contains the mean percentage correct classification in each cross-validation for a test set size and gives the total number of samples of white and Iberian samples that were incorrectly classified. The most important variables in set A (500 nm wavelength) and set B (577 nm) are attributable to the main pigment in meat, i.e., myoglobin. There was a lower percentage of correct classifications with the MI model (set A) than with the VIS/NIR SC model (Set B), despite the larger amount of MI for the former (0.6471) versus the latter (0.6246). The VIS/NIR SC had less MI but showed a better fit with the algorithm data, and the values

obtained from the literature were more relevant to the Neural Network Classification than were those derived from MI Ranking. Misclassified samples of white pork had a value of 1 in all of the training/test assumptions, whereas more Iberian pork samples were misclassified. This difference is explained by the very high purity of the white pigs (Duroc breed) compared with the Iberian pigs, in which there is a genetic mixture of characteristics of the Iberian breed with those of the Duroc breed. Comparison between the MI and VIS/NIR SC models shows that, using the same Neural Network Classification, the percentage of correct classifications is higher for the VIS/NIR SC model, which obtained a very accurate classification for Iberian pork. Because only 30 pigs were studied, the percentages of correct classification are highly influenced by the ratio between the number of training and test cases, although much better results were always obtained with VIS/NIR SC than with MI Ranking. The VIS/NIR SC yielded an accuracy of more than 90% for a single wavelength value (wavelength 577 nm) in the classification between white and Iberian breeds. Nevertheless, it is difficult to discriminate between the two breeds on the basis of wavelength 577 nm because of its continuous nature, since it is attributable to the myoglobin and many factors can influence its oxidation state, including the type of packing (Mancini & Hunt, 2005). At any rate, the consumer can make a relatively accurate classification with the naked eye, with the color of the meat being the main characteristic.

When three input variables were used for the Neural Network Classification (see Table 2), a very high percentage of correct classifications was obtained with both models. The accuracy of the MI model (set A) was greater than 95% in all training/test assumptions, classifying the Iberian pork with no errors for the three most important wavelengths in the MI ranking, i.e., 500, 353 and 996 nm. With the VIS/NIR SC model, none of these three wavelengths corresponded to the maximum peak absorbance wavelength, although they were included in the three main absorbance peaks according to the VIS/NIR SC model: myoglobin pigment, Soret band, and transition area between the visible and near-infrared areas of the spectrum. In set B, as reported in the previous section, took the maximum wavelengths close to the same points selected by MI but for the VIS/NIR SC model, i.e., 577, 545, and 414 nm. With these three wavelengths, the classification produced by the

VIS/NIR SC was worse but much more real than that produced by the MI model. We were working with maximum wavelength peaks derived from the literature and we know that these absorbances are due to specific components of meat. In all training/test assumptions (with the exception of 27/3 and 20/10, when a classification accuracy of 93.33% was obtained), an accuracy of more than 95% was achieved and the classification of the Iberian samples was perfect. It is evident that the small number of animals studied (15 Iberian pigs and 15 white pigs) was a major limitation in the training and test sub-sets, and that a study with a larger number of animals is warranted once the utility of the model is established.

In the Neural Network Classification with 10 input variables, the classification accuracy percentages were much lower and very similar between the MI and VIS/NIR SC models. More Iberian pork samples were misclassified compared with the Neural Network Classification with 1 and 3 variables. This is because neural networks do not function well with so many wavelengths, some of which had a very low or zero amount of MI (see Table 1). This suggests that certain wavelengths contribute no relevant information to the Neural Network, and it is therefore better to remove them from the system. The sum of the amounts of MI derived from the MI Ranking was 29.02% higher than from the VIS/NIR SC. Hence, the Neural Network functions better with the MI Ranking, because the ranking of the selected variables are higher.

Overall, there were more misclassified Iberian than white pork samples (Table 2). Although this appears to contradict the description afforded by the algorithm, in which the centers of the RBFs give priority to the Iberian pork samples for their more precise classification, it really reflects the greater genetic mix of the Iberian breed, which has traditionally been crossed with Duroc or other white breeds to improve their productive characteristics and profitability. This explains the worse classification outcomes for the Iberian pork, since one group comprised pure white pigs and the other group included Iberian pigs with different percentages of Duroc x Iberian mixture. Further study is required with a larger sample of pigs and a more precise knowledge of the mixture between Duroc and Iberian breeds in order to assess the accuracy of this technology.

Because of our small sample size, the percentage of accurate classifications decreased with an increase in the size of the test set. More errors

were also observed when more wavelengths were used to identify each pig, an expected finding, since the dimensionality of the problem is considerably increased, exponentially expanding the solution space. The more the solution space grows, the more samples are required to identify the parameters of the network so that it can make an accurate classification.

4.3.6. CONCLUSIONS.

This paper presents a combination of VIS/NIRS techniques and Artificial Neural Network as a method to classify different breeds of pork for application in the food industry. Optical properties of the samples yielded an excellent differentiation between white and Iberian breeds. The results reported here indicate that VIS/NIRS can be useful for the objective identification of pig breed. Artificial Neural Network based on data derived from VIS/NIRS models, as a function of Mutual Information or VIS/NIR Spectra Characterization, correctly classified 95% of samples when three wavelengths were entered as input variables. This approach appears to be an objective and rapid method for the authentication and identification of white and Iberian pork.

4.3.7. ACKNOWLEDGEMENTS.

The authors are especially grateful to María Dolores Rodríguez, Francisca Sáez and Jorge A. Payá, technicians at the Department of Pathology of University of Granada for their contribution. This study was funded by the *Corporación Tecnológica de Andalucía, Cooperativa del Valle de los Pedroches (COVAP), Bodegas Campos Catering, CICYT (project TIN2004-01419), and Ministerio de Educación y Ciencia, Infraestructura Científico Tecnológica (MEC-JA-FEDER UNGR 05-23-036).*

4.3.8. REFERENCES.

- Astakhov, S., Grassberger, P., Kraskov, A., & Stögbauer, H. Mutual Information Least-Dependent Component Analysis:
<http://www.klab.caltech.edu/~kraskov/MILCA/> (last access: June 1st, 2007).
- BOE, 15 de octubre del (2001). Real Decreto 1083/2001, de 5 de Octubre, Norma de calidad para el jamón ibérico, paleta ibérica y caña de lomo ibérico elaborados en España.
- Bonnlander, B.V., & Weigend, A.S. (2004). Selecting input variables using mutual information and nonparametric density estimation. In *Proceedings of the ISANN, Taiwan, 2004*.
- Brøndum, J., Munck, L., Henckel, P., Karlsson, A., Tornberg, E., & Engelsen, S.B. (2000). Prediction of water-holding capacity and composition of porcine meat by comparative spectroscopy. *Meat Science*, 55, 177-185.
- Cen, H., & He, Y. (2007) Theory and application of near infrared reflectance spectroscopy in determination of food quality. *Trends in Food Science & Technology*, 18, 72-83.
- Cozzolino, D., Barlocco, N., Vadell, A., Ballesteros, F., & Gallieta, G. (2003). The use of visible and near-infrared reflectance spectroscopy to predict colour on both intact and homogenised pork muscle. *LWT – Food Science and Technology*, 36, 195-202.
- Cozzolino, D., & Murray, I. 2004. Identification of animal meat muscles by visible and near infrared reflectance spectroscopy. *LWT – Food Science and Technology*, 37, 447-452.
- Fernández-Cabanás, V.M., Garrido-Varo, A., García-Olmo, J., De Pedro, E., & Dardenne, P. (2006). Optimisation of the spectral pre-treatments used for

Iberian pig fat NIR calibrations. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 87, 104-112.

González-Martín, I., González-Pérez, C., Álvarez-García, N., & González-Cabrera, J.M. (2005). On-line determination of fatty acids 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.

Guillén, A., Rojas, I., González, J., Pomares, H., Herrera, L.J., & Fernández, F. (2006). Multiobjective RBFNNs Designer for Function Approximation: An Application for Mineral Reduction. *Lecture Notes in Computer Science*, 4221, 511-520.

Guillén, A., Rojas, I., González, J., Pomares, H., Herrera, L.J., & Prieto, A. (2006). A Fuzzy-Possibilistic Fuzzy Ruled Clustering Algorithm for RBFNNs Design. *Lecture Notes in Computer Science*, 4259, 647-656.

Guillén, A., Rojas, I., González, J., Pomares, H., Herrera, L.J., Valenzuela, O., & Prieto, A. (2005). A Possibilistic Approach to RBFN Centers Initialization. *Lecture Notes in Computer Science*, 3642, 174-183.

Guillén, A., Rojas, I., González, J., Pomares, H., Herrera, L.J., Valenzuela, O., & Prieto, A. (2005). Improving Clustering Technique for Functional Approximation Problem Using Fuzzy Logic: ICFA algorithm. *Lecture Notes in Computer Science*, 3512, 272-280.

Guillén, A., Rojas, I., Ros, E., & Herrera, L.J. (2005). Using Fuzzy Clustering Technique for Function Approximation to Approximate ECG Signals. *Lecture Notes in Computer Science*, 3562, 538-547.

- Herrera, L.J., Pomares, H., Rojas, I., Verleysen, M., & Guillen, A. (2006). Effective Input Variable Selection for Function Approximation. *Lecture Notes in Computer Science*, 4131, 41-50.
- 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., & Lambooi, en E. (2005). Perspective of NIRS measurements early post mortem for prediction of pork quality. *Meat Science*, 69, 417-423.
- Josell, A., Martinsson, L., Borggaard, C., Andersen, J. R., & Tornberg, E. (2000). Determination of RN⁻ phenotype in pigs at slaughter-line using visual and near-infrared spectroscopy. *Meat Science*, 55, 273-278.
- Kraskov, A., Stögbauer, H., & Grassberger, P. (2004). Estimating mutual information. *Physics Review E*, 69, 066138.
- Mancini, R. A., & Hunt, M. C. (2005). Current research in meat color. *Meat Science*, 71, 100-121.
- MAPA (2004). <http://www.mapa.es>. (Available on-line: February 19th, 2007).
- Ortiz-Somovilla, V., España-España, F., De Pedro-Sanz, E.J., & Gaitán-Jurado, A.J. (2005). Meat mixture detection in Iberian pork sausages. *Meat Science*, 71, 490-497.
- 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.
- Ramírez, M.R., & Cava, R. (2007). Effect of Iberian X Duroc genotype on dry-cured loin quality. *Meat Science*, 76, 333-341.

- Savenije, B., Geesink, G.H., van der Palen, J.G.P., & Hemke, G. (2006). Prediction of pork quality using visible/near-infrared reflectance spectroscopy. *Meat Science*, 73, 181-184.
- Shackelford, S.D., Wheeler, T.L., & Koohmaraie, M. (2004). Development of optimal protocol for visible and near-infrared reflectance spectroscopic evaluation of meat quality. *Meat Science*, 68, 371-381.
- Stögbauer, H., Kraskov, A., Astakhov, S.A., & Grassberger, P. (2004). Least dependent component analysis based on mutual information. *Physics Review E.*, 70, 066123.
- Swatland, H.J. (1994). Physical measurements of meat quality: optical measurements, pros and cons. *Meat Science*, 36, 251-259.
- Uykan, Z., Güzelis, C., Celebei, M.E., & Koivo, H.N. (2000). Analysis of Input-Output Clustering for Determining Centers of RBFN. *IEEE Transactions on Neural Networks*, 11, 851-858.
- Xia, J.J., Berg, E.P., Lee, J.W., & Yao, G. (2007). Characterizing beef muscles with optical scattering and absorption coefficients in VIS-NIR region. *Meat Science*, 75, 78-83.

Table 1.3. The most important wavelengths obtained by Mutual Information or VIS/NIRS Spectra Characterization for the classification of white and Iberian pork, with their respective Mutual Information Rankings and amount of Mutual Information and the corresponding side of *M. masseter*.

Mutual Information Ranking (set A)				VIS/NIRS Spectra Characterization (set B)			
Wavelength (nm)	MI ranking	Side	Amount of Mutual Information	Wavelength (nm)	MI ranking	Side	Amount of Mutual Information
500	1	Lean	0.6471	414	260	Lean	0.4672
353	14	Lean	0.6368	545	180	Lean	0.5771
996	232	Lean	0.4833	577	53	Lean	0.6246
1073	280	Lean	0.4647	763	646	Lean	0.4023
955	288	Lean	0.4608	983	248	Lean	0.4706
1116	351	Lean	0.4544	1207	821	Lean	0.3532
1888	660	Marbled	0.3981	1446	2003	Lean	0.1372
2018	814	Marbled	0.3597	1722	1279	Lean	0.2459
2292	832	Marbled	0.3469	1928	2858	Marbled	0.0142
2422	957	Marbled	0.3220	2307	3729	Marbled	0
			$\Sigma = 4.5738$				$\Sigma = 3.2011$

Table 2.4. Neural Network Classification of white and Iberian pork using Mutual Information (set A) or VIS/NIRS Spectra Characterization (set B), entering different numbers of input variables as a function of the most important wavelengths.

Neural Network: 1 input variable						
Mutual Information Ranking				VIS/NIRS Spectra Characterization		
Set A = {500} (nm)				Set B = {577} (nm)		
Test Set Size	% correct	White incorrect	Iberian incorrect	% correct	White incorrect	Iberian incorrect
1	70.00	1	8	90.00	1	2
2	83.33	1	4	93.33	1	1
3	90.00	1	2	93.33	1	1
5	90.00	1	2	93.33	1	1
6	83.33	1	4	93.33	1	1
10	76.60	1	6	93.33	1	1

Neural Network: 3 input variables						
Mutual Information Ranking				VIS/NIRS Spectra Characterization		
Set A = {500, 353, 996} (nm)				Set B = {577, 545, 414} (nm)		
Test Set Size	% correct	White incorrect	Iberian incorrect	% correct	White incorrect	Iberian incorrect
1	100.00	0	0	96.67	1	0
2	100.00	0	0	96.67	1	0
3	100.00	0	0	93.33	1	1
5	96.60	1	0	96.67	1	0
6	100.00	0	0	96.67	1	0
10	96.60	1	0	93.33	1	1

Neural Network: 10 input variables						
Mutual Information Ranking				VIS/NIRS Spectra Characterization		
Set A = {500, 353, 996, 1073, 955, 1116, 1888, 2018, 2292, 2422} (nm)				Set B = { 577, 545, 414, 763, 983, 1207, 1446, 1722, 1928, 2307} (nm)		
Test Set Size	% correct	White incorrect	Iberian incorret	% correct	White incorrect	Iberian incorret
1	90.00	1	2	86.67	1	3
2	93.30	0	2	90.00	1	2
3	93.30	1	1	93.33	1	1
5	86.67	1	3	90.00	0	3
6	76.67	5	2	76.67	2	5
10	76.67	3	4	73.33	8	0

Figure 1.8. A Radial Basis Function Neural Network.

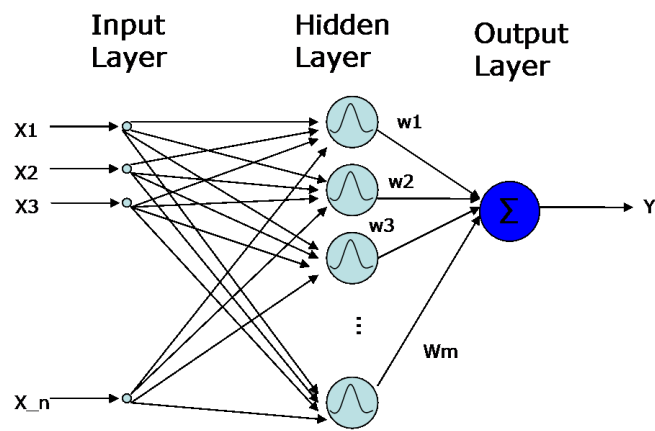


Figure 2.9. Mutual Information of the 4302 study variables. Variables 1-2151: lean side; variables 2152-4302: marbled side.

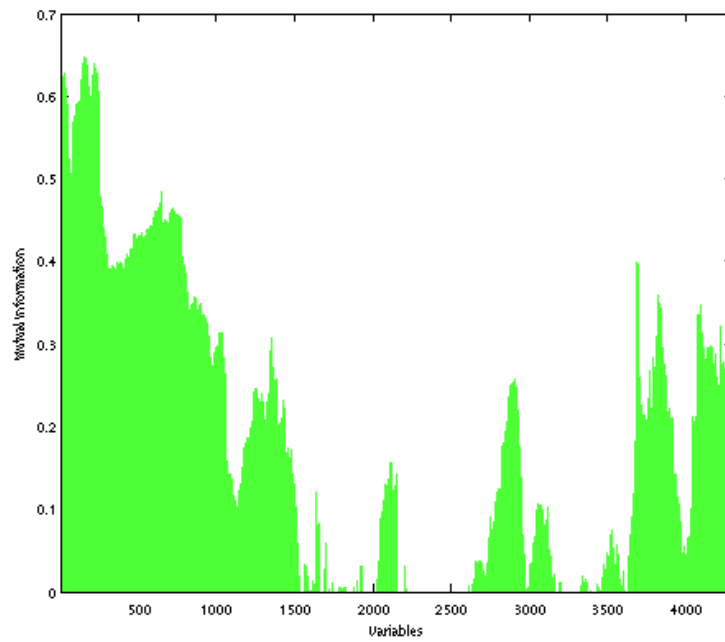


Figure 3.10. Mean of reflectance values in the VIS/NIR range of the spectrum. 1: White pork, lean side. 2: Iberian pork, lean side. 3: White pork, marbled side. 4: Iberian pork, marbled side.

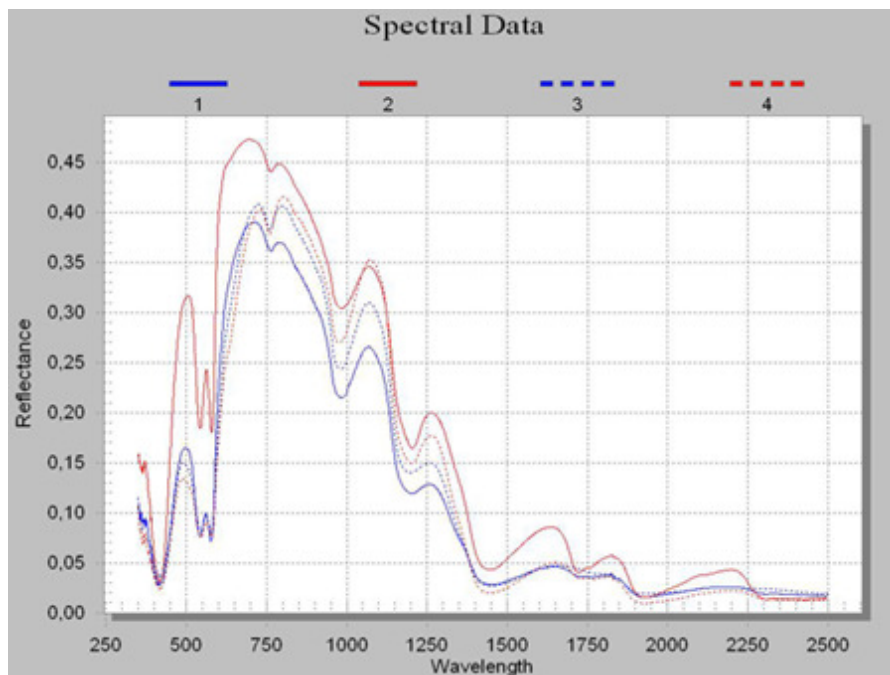
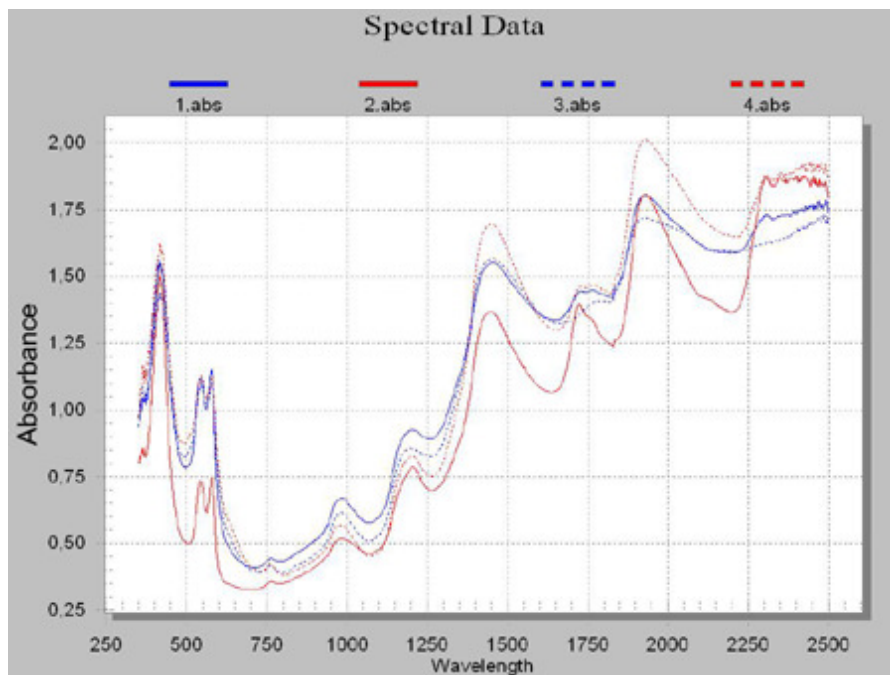


Figure 4.11. Mean of absorbance values in the VIS/NIR range of the spectrum. 1: White pork, lean side. 2: Iberian pork, lean side. 3: White pork, marbled side. 4: Iberian pork, marbled side.



5. DISCUSIÓN GENERAL

5. DISCUSIÓN GENERAL

En una primera fase del estudio se llevó a cabo la adaptación y desarrollo de una aplicación para cuantificar de forma automática el tejido conectivo intramuscular y la retracción muscular en imágenes histológicas microscópicas de carne basada en un software diseñado para la cuantificación y valoración por histo-videomicroscopía de la fibrosis en muestras renales y hepáticas dentro del ámbito de la Anatomía Patológica.

La adaptación de este programa tuvo como objetivo la cuantificación automática del tejido conectivo intramuscular y la retracción de las fibras musculares en imágenes tomadas a través de un sistema de visión artificial acoplado a un microscopio sobre muestra de tejido de diferentes carnes animales. Esta aplicación desarrollada consta de diferentes módulos, ya comentados en el Capítulo I del apartado Resultados: captura automática, umbralización automática, algoritmos de filtrado morfológico, identificación del tejido conectivo intramuscular y análisis de imagen, como se puede observar en la Figura 1 del Capítulo I del apartado Resultados.

La captura automática de la imagen consistió en la captura y mejora automática de las imágenes microscópicas eliminando los niveles de gris de la preparación histológica en áreas sin tejido, llevando a cabo una normalización de los niveles de gris del histograma en imágenes teñidas con rojo Sirio o hematoxilina-eosina en muestras cárnicas. La imagen digital normalizada y la función de control de la adquisición asegura la total reproducibilidad intraobservador para las condiciones de adquisición de la imagen. Se validó la eficacia de la función de control de adquisición para mejorar la objetividad y reproducibilidad de las condiciones de apertura del condensador del microscopio. Sifre-Maunier et al. (2006) confirman que la alta sensibilidad de los métodos basados en mapas probabilísticos de umbralización para fondos heterogéneos a bajos niveles ϵ , desde que se selecciona el nivel de gris para obtener los segmentos delgados y posteriormente tiende a binarizar ruidos falsos de fondo. Para evitar las interferencias causadas por la iluminación y las aberraciones de la cámara, en la aplicación desarrollada las sombras detectadas por el sistema en la imagen digitalizada son corregidas por comparación de la imagen píxel por píxel con una imagen de fondo previamente capturada. Una vez realizada esta corrección, la imagen saliente es normalizada.

Para la segmentación automática en la imagen de las áreas fuertemente teñidas con rojo Sirio o hematoxilina-eosina se usó el método de umbralización global de Kurita et al. (1992), obteniéndose una imagen binaria umbralizada que representa la matriz extracelular del intersticio muscular, constituido por diferentes tipos de colágeno y proteínas no fibrilares, y las células musculares. Un segundo algoritmo de umbralización, diseñado por Kittler & Illingworth (1986) fue implementado en la imagen inicial para detectar bajos niveles de gris, de forma que las áreas levemente teñidas con rojo Sirio y que no han sido segmentado por el método de Kurita queden aisladas e incluidas en el análisis. Sifre et al. (2005), usando un método de umbralización adaptativa basado en mapas probabilísticos y con un nivel de confianza (grado de libertad del algoritmo) del 80%, afirma que sus modelos son menos eficientes cuando la segmentación elimina la red delgada por estar ajustada con un nivel de confianza ϵ menor e igual al 40%. Sifre-Maunier et al. (2006) usan mapas probabilísticos de umbralización y encuentran que una amplia variabilidad en los resultados es debida al nivel de confianza ϵ usado para determinar la umbralización óptima. A altos niveles de confianza ϵ (70, 75 y 80%), correspondientes a una umbralización para red gruesa de tejido conectivo intramuscular, el error estándar se incrementó; a bajos niveles de ϵ , el espesor de los segmentos secundarios (segmento delgados) fue sobrestimado (Sifre-Maunier et al., 2006).

Estos mismos autores afirman que las reglas de umbralización para mapas probabilísticos dependen del nivel ϵ , mientras que el algoritmo de umbralización de Rosin y el algoritmo de Otsu son solamente adaptativos para el contexto de la imagen y arrojan un único valor de umbralización independientemente del valor de ϵ (Sifre-Maunier et al., 2006). La aplicación desarrollada, basada en una modificación del algoritmo de Otsu, arroja un único valor de umbralización, el cual es considerado en nuestro trabajo como esencial para la veracidad y reproducibilidad intra- e interobservador de los resultados.

Sifre-Maunier et al. (2006) encuentran que el algoritmo de umbralización de Rosin y el algoritmo de Otsu no llevan a cabo una cuantificación de los segmentos delgados del tejido conectivo intramuscular, los cuales son segmentados a niveles de confianza por debajo del 70%. Este error fue corregido en la aplicación desarrollada por nuestro grupo aplicando un segundo

algoritmo usando la umbralización de Kittler & Illingworth (Kittler & Illingworth, 1986), como se describe en Masseroli et al. (1998) y Masseroli et al. (2000). Este algoritmo de filtrado morfológico diseñado fue aplicado para detectar bajos niveles de gris y aislar áreas débilmente teñidas y no segmentadas por el método de Kurita. En la región intersticial de la imagen, las áreas de tejido conectivo intramuscular fueron identificadas como elementos con un área mayor de $35 \mu\text{m}^2$. Las áreas de tejido conectivo intramuscular de forma alargada de menor tamaño fueron separadas de los núcleos de las células musculares por dilatación “hit or miss” y el operador Boolean, siendo clasificadas como objetos diana cuando alcanzaban una longitud geodésica mayor de 13 píxel ($\approx 11 \mu\text{m}$), esquematizados en las Figuras 2 y 3 del Capítulo I del apartado Resultados.

Para la determinación de la longitud geodésica se aplicaron algoritmos de iteración combinados con operaciones lógicas y de morfología matemática sobre la imagen binaria, representados en la Figura 4 del Capítulo I del apartado Resultados. Se determinaron en primer lugar los centroides de los objetos en la imagen y se iteraron sucesivamente por operaciones lógicas y de dilatación para reconstruir los objetos iniciales y generar una imagen en la cual a cada píxel de cada elemento aislado le fue asignado un nivel de gris igual a la longitud geodésica entre ese píxel y el píxel más lejano de ese mismo elemento. Los centroides fueron determinados por la aplicación iterativa del comando de morfología matemática “Thinning” en las imágenes binarias de los objetos hasta su convergencia usando elementos de la llamada configuración D en todas las posibles rotaciones de los elementos estructurales. Se aplicó la secuencia de operaciones “Dilation” y “And” iterativamente para provocar el relleno de huecos sobre el negativo de la imagen negativa de los objetos sin huecos, como se esquematiza en la Figura 4 del Capítulo I, apartado Resultados.

Para el entrenamiento del algoritmo se usaron 300 imágenes para determinar las condiciones de apertura óptima del condensador del microscopio para la captura y digitalización de las imágenes. Se usaron el test de penalización de Tukey y el método de Newman-Keuls para la comparación múltiple entre valores medios de pares de imágenes capturadas con la misma apertura de diafragma, no encontrándose diferencias significativas con evaluaciones con aperturas entre 1'5 y 6. Estas observaciones fueron repetidas en días

sucesivos y del resultado de ambos análisis se calculó el porcentaje de acuerdo intra e interobservador para la determinación de los rangos de apertura óptimos siguiendo el modelo de Masseroli et al (1998) y Masseroli et al. (2000), no siendo significativas las diferencias encontradas ($p > 0.1$). Sifre-Maunier et al. (2006) concluyen que el factor limitante de los métodos por mapas probabilísticos de umbralización es el paso de aprendizaje para construir las reglas de umbralización, las cuales deben de ser cargadas para cada modificación de las condiciones de adquisición. La aplicación desarrollada fue validada con la misma metodología y procesamiento de datos que la usada por Masseroli et al., (1998) y Masseroli et al., (2000). Para asegurar la exactitud del método automático propuesto, los valores de tejido conectivo intramuscular obtenidos en imágenes por el método de umbralización automática de Kurita et al (1992) fueron comparadas con valores de umbralización manual de referencia mediante tres métodos de umbralización alternativa: el método de Kittler e Illingworth con distribución Gausiana de los niveles de gris (Kittler & Illingworth, 1986); el método de Kittler e Illingworth con distribución de Poisson de los niveles de gris; y el método isodata corregido.

En el estudio llevado a cabo por Sifre-Maunier et al. (2006), 20 jueces no entrenados trazaron los que consideraron que no era tejido conectivo intramuscular usando una línea negra gruesa sobre la imagen. Sifre-Maunier et al. (2006) concluyen que los jueces no expertos deberían ser entrenados para generar trazados de tejido conectivo intramuscular más consensuados, otorgando así mayor robustez a nuestro modelo. La reproducibilidad intra- e interoperador fue validada en nuestro estudio por cuatro observadores expertos independientes, no encontrando diferencias significativas ($p < 0.05$) y consiguiendo un acuerdo intraobservador $>95\%$ e interobservador $>90\%$.

Una vez adaptada la aplicación, se procedió al estudio de carnes de diferentes especies animales y músculos de diferentes partes de su anatomía (ver tabla 1 del Capítulo I del apartado Resultados). Diversos autores han confirmado la existencia de correlación entre el análisis de imagen y la determinación bioquímica de la hidroxiprolina para la cuantificación del colágeno, confirmando la exactitud de la técnica descrita (Kalaria & Pax, 1995; Nicoletti et al., 1996; Sifre et al., 2005; Sifre-Maunier et al., 2006), así como una clara correlación entre el contenido total de colágeno y la dureza de la carne y una correlación

altamente positiva entre el test de fuerza de Warner-Bratzler y el contenido total de colágeno ($r=0.723$, $p<0,01$) (Torrescano et al., 2003). El tejido conectivo intramuscular y su distribución espacial, que define el veteado, son de gran importancia para definir las múltiples características de la carne que influyen en la calidad de la misma, porque están relacionadas directamente con la ternura (Lepetit & Culioli, 1994, Purslow, 2005).

En nuestras cuantificaciones se observaron diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje y área ocupada por tejido conectivo intramuscular ($p<0.001$, Kruskal Wallis). El músculo *masseter* de la raza de vaca Rubia Gallega ocupa el mayor porcentaje de tejido conectivo intramuscular ($p=0.009$, Mann-Whitney U test), seguido del músculo *longissimus thoracis* en el cerdo ibérico, el músculo *longissimus thoracis* de cordero, *triceps brachii* de cordero, *longissimus thoracis* de buey de Kobe, *pectoralis major* en pichón y por último el músculo *longissimus thoracis* en carne de vaca Rubia Gallega.

Nakamura et al. (2003) obtienen en cerdos machos castrados ([LandracexDuroc] ♀ xDuroc ♂) unos porcentajes de área total ocupada por colágeno en el músculo *longissimus thoracis* muy similares a los obtenidos en este estudio para cerdos híbridos Large White , con unos valores de $25.4\%\pm 0.9$ en colágeno tipo I y $37.6\%\pm 1.0$ en colágeno tipo III para Nakamura et al. (2003) frente al $22.59\%\pm 0.87$ de porcentaje de perimio obtenido en el presente estudio. Hay que tener en cuenta que el objetivo de aumento usado por Nakamura et al. (2003) fue el 2x, mientras que en nuestro estudio se usó el objetivo de 20x aumentos. Este hecho debe ser estudiado con más profundidad para evaluar la posible existencia de un sistema fractal en las preparaciones microscópicas de carne para la observación y cuantificación de tejido conectivo intramuscular, en donde los valores obtenidos serían independientes de la escalada de observación.

Sifre et al. (2005) y Sifre-Maunier et al. (2006) han usado la misma técnica histológica que en el presente estudio (tinción rojo Sirio), aunque en su caso usaron como material biológico cortes crioconservados en lugar de muestras embebidas en parafina. En ambos estudios se tiñó el colágeno del tejido conectivo intramuscular en *longissimus thoracis* con rojo Sirio, aplicando un filtro verde para mejorar el contraste y usaron el software Visilog para llevar a cabo el análisis de imagen, al igual que en el presente estudio. La única

diferencia entre los estudios llevados a cabo por Sifre et al. (2005) y Sifre-Maunier et al. (2006) es la escala de observación y las razas animales estudiadas, siendo la metodología exactamente la misma. De este modo, Sifre et al. (2005) y Sifre-Maunier et al. (2006) adquirieron imágenes con un objetivo de magnificación de 2x, mientras que en el estudio desarrollado en esta tesis doctoral se ha usado un objetivo de 10x para la cuantificación del tejido conectivo intramuscular y un objetivo de 20x para la cuantificación del perimio y la retracción de la fibra muscular.

Sifre et al. (2005) informan de un porcentaje de tejido conectivo intramuscular del 2.8 ± 0.4 en *longissimus thoracis* de la raza Charolais de 5 años de edad con un nivel de confianza en la umbralización (ϵ) de 0.80 y Sifre-Maunier et al. (2006) ofrece un porcentaje de tejido conectivo intramuscular de 3.1 y 14.0 en *longissimus thoracis* para vaca de la raza Charolais de 3 a 7 años de edad con valores ϵ de 0.80 y 0.55, respectivamente. En nuestro estudio encontramos un porcentaje de tejido conectivo intramuscular de $3.20\% \pm 0.98$ en *longissimus thoracis* de vaca Rubia Gallega y un $4.37\% \pm 1.20$ en buey de Kobe. Los datos obtenidos para la vaca Rubia Gallega están en concordancia con los obtenidos por Sifre et al. (2005) y Sifre-Maunier et al. (2006), a pesar del uso de diferentes objetivos de magnificación y, por tanto, diferente escala de observación. Estos resultados arrojan de nuevo el interrogante si el tejido conectivo intramuscular de la carne constituye un sistema fractal. Muy probablemente la mayor presencia de tejido conectivo intramuscular en la carne de buey de Kobe sea debida a la mayor edad de los animales en el momento del sacrificio así como a la dieta rica en calorías a la que son sometidos estos animales, necesitando por tanto un desarrollo mayor del tejido conectivo intramuscular como estructura organizativa de la grasa intramuscular. El tamaño del perimio es significativamente diferente en los distintos músculos estudiados ($p < 0.001$, Kruskal Wallis). El área ocupada por el perimio es significativamente mayor en el músculo *masseter* de la raza Rubia Gallega de vaca comparado con otras especies ($p < 0.05$, test U de Mann-Whitney) y el valor menor se presenta en el músculo *longissimus thoracis* del buey de Kobe ($p < 0.05$, test U de Mann-Whitney). En nuestro estudio encontramos diferencias estadísticamente significativas en las preparaciones de carne teñidas con rojo Sirio en el músculo *longissimus thoracis* entre cerdo

blanco de la raza híbrida Large White y cerdo ibérico. Los cerdos ibéricos tiene un mayor porcentaje de tejido conectivo intramuscular ($17.02\% \pm 14.99$ vs. $4.00\% \pm 2.15$; $p=0.028$, test U de Mann-Whitney), mientras que la raza híbrida Large White presenta un mayor porcentaje de perimio ($22.59\% \pm 0.87$ vs. $9.93\% \pm 4.95$; $p=0.009$, test U de Mann-Whitney).

Diferencias significativas fueron encontradas entre las diferentes especies estudiadas para la retracción de la fibra muscular ($p<0.001$, Kruskal-Wallis). El mayor grado de retracción fue observado en el músculo *longissimus thoracis* del buey de Kobe y la menor en *longissimus thoracis* de carne de cordero. Diferencias significativas también fueron encontradas entre los diferentes músculos estudiados dentro de la misma especie ($p<0.05$, test U de Mann-Whitney). El grado de retracción no se correlacionó con el porcentaje de área ocupado por tejido conectivo intramuscular y tampoco se observó correlación significativa con el porcentaje ocupado por perimio en las muestras observadas (Rho de Spearman).

La visión artificial ha sido reconocida como el acercamiento más prometedor al aseguramiento objetivo de la calidad de la carne (Tan, 2004). Diversas investigaciones han mostrado que las técnicas clásicas de análisis macroscópico de imágenes solo explican un pequeño porcentaje en las variaciones de palatabilidad medidas como ternura de la carne (Li et al., 1999; Li et al., 2001). En comparación con métodos convencionales, la visión artificial acoplada a sistemas de microscopía ofrece información adicional en parámetros relativos a la organización y arquitectura del tejido conectivo intramuscular y la grasa intramuscular (ver Figura 4 del Capítulo I, apartado Resultados). Wheeler et al. (2002) concluyen que los métodos no invasivos para predecir la ternura de la carne basados principalmente en el color de la parte magra no son suficientemente exactos para garantizar su uso.

Como complemento a la tecnología de visión artificial en cortes histológicos que acabamos de comentar, en una segunda parte del estudio se desarrollaron técnicas no invasivas y con un alto potencial de análisis como es la reflectancia espectral en el rango visible e infrarrojo del espectro. Se trata de un método no invasivo, directo, instantáneo, barato, portátil, de uso fácil y sin preparación de la muestra, además de presentar una alta fiabilidad y es usado para la

predicción de grasa intramuscular (Hoving-Bolink et al., 2005; Savenije et al., 2006), ternura de la carne (Byrne et al., 1998; Hildrum et al., 1994; Hildrum et al., 1995; Liu et al., 2003; Naes & Hildrum, 1997; Park et al., 1998; Shackelford et al., 2005), composición de ácidos grasos (González-Martín et al., 2005; Fernández-Cabanás et al., 2006), color (Cozzolino et al., 2003) o presencia del alelo genético RN⁻, causante de la hipertermia maligna porcina (Josell et al., 2000), entre otras determinaciones, así como para la detección de fraudes por mezclas con carnes de menor calidad, especialmente en embutidos (Cozzolino & Murray, 2004; Ortiz-Somovilla et al., 2005; Ortiz-Somovilla et al., 2007).

Previo a la aplicación de la tecnología de reflectancia espectral sobre las muestras, se procedió al estudio macroscópico de los músculos *masseter*. Tanto en cerdo blanco como en cerdo ibérico se observó que el músculo *masseter* presenta una histología especial. Macroscópicamente se puede observar un gran desarrollo del tejido conectivo intramuscular. En el caso del cerdo ibérico, este desarrollo del tejido conectivo intramuscular es mayor. La estructuración de este veteado es debida al desarrollo hipertrófico del perimio en la raza ibérica, en donde se va a llevar a cabo la especial acumulación de grasa a la que esta raza de cerdo está predispuesta genéticamente.

La fascia externa del músculo *masseter* es muy magra, con un leve veteado a nivel superficial. La histología de este lado del músculo es muy homogénea, con una gran dominancia de fibras musculares estriadas. En contraste, la fascia interna que delimita la cavidad bucal muestra un gran veteado que es visible macroscópicamente, con presencia de grandes vetas compuestas por tejido conectivo intramuscular y grasa intramuscular, alcanzando algunas de ellas varios milímetros de grosor.

Como consecuencia de este hecho, el lado del músculo *masseter* por el cual realizamos la medida de reflectancia va a ser importante en la calidad de los espectros de reflectancia captados. En el lado veteado del músculo el elevado número de vetas de tejido conectivo y grasa van a interferir en la toma de la medida de reflectancia espectral, ya que la medida queda condicionada a la zona en la que coloquemos la sonda VIS/NIRS. Estas grandes vetas pueden llegar a tener casi 1 cm. de grosor, por lo que el espectro de reflectancia captado presenta un error de muestreo muy elevado derivado de la colocación de la sonda sobre el lado veteado. Por contra, por el lado magro del músculo

masseter podemos observar que presenta una mayor homogeneidad en su histología macroscópica, siendo inexistentes las grandes vetas. Los resultados de reflectancia espectral obtenidos por el lado magro fueron más relevantes para la clasificación entre cerdo blanco e ibérico que los espectros obtenidos por el lado vetado, como se puede observar en la Figura 2 del Capítulo II del apartado Resultados, en donde se observa que la información mutua presente en los espectros del lado magro del músculo *masseter* derecho es mucho más abundante que en el resto de espectros. Curiosamente se puede observar en esta misma tabla de información mutua de los diferentes lados del músculo *masseter* (lado magro y vetado), así como las dos localizaciones bilaterales del mismo (lado izquierdo y derecho del animal) presentan diferentes tipos de espectros. Shackelford et al. (2005), usando el mismo hardware de cuantificación de la reflectancia espectral, detectan un fenómeno parecido en carne de vaca, detectando hasta un 40% de variación aleatoria en la reflectancia espectral de lados opuestos de la canal, especialmente entre 1.300 y 2.500 nm.

En una primera aproximación a los datos de reflectancia espectral se trabajó con 4 espectros diferentes, procedentes de todos los animales por los lados magro y vetado del músculo *masseter* de los dos lados de la canal. El algoritmo aplicado para calcular la información mutua de las longitudes de onda de los espectros de cerdos blancos e ibéricos, obteniéndose un ranking con las longitudes de onda más relevantes. Los clasificadores fueron obtenidos por entrenamiento de los respectivos modelos aplicando la variable con mayor información mutua con respecto a la salida.

Las RBFNN (redes neuronales de funciones de base radial) generadas con el algoritmo FPCFA (clustering difuso-probabilístico para aproximación funcional) obtienen los mejores resultados en comparación con las otras diseñadas usando FCM (algoritmo de las C-medias difuso) y SVM (máquinas de vectores de soporte). La razón por la que FPCFA ejecuta mejor que FCM para cualquier número de variables es debido a la suma de parámetro supervisado y la combinación de dos tipos de partición: probabilística y difusa. La RBFNN coge la clasificación de máximo rendimiento usando una variable y si el número de variable se incrementa, estos no pueden ejecutarse el menor número de variables. Cuando introducimos otras variables, estamos añadiendo más

información pero al mismo tiempo el espacio solución está siendo incrementado exponencialmente. Por tanto, dado que las RBFNNs son modelos locales, se ejecutan mejor en dimensiones pequeñas. Los SVM usados para los experimentos fueron obtenidos por la implementación de Broomhhead et al. (1988), teniendo un módulo gaussiano con $\gamma = 1$ y la constante $C=30$ para penalizar mucho las muestra no clasificadas, presentando un rendimiento muy alto. Los tres modelos de red neuronal ensayados clasifican correctamente las muestras en todos los casos por encima del 97%. Una vez analizadas las diferentes redes neuronales procedimos a llevar a cabo una clasificación del músculo *masseter* del lado derecho de los animales, tanto cerdos ibéricos como blancos. La finalidad de esta experiencia era comparar los sistemas de análisis de la información mutua con la caracterización del espectro siguiendo la bibliográfica científica, para aplicarles con ambos modelos el análisis por redes neuronales, como se detalla en el Capítulo III del apartado Resultados.

Derivado de la información mutua se obtuvo un ranking con 4302 variables para cada animal (2151 longitudes de onda/espectro, tomada para 2 lados del M. *masseter*, lado magro y lado veteado), de las cuales se seleccionaron para trabajar las 1000 primeras variables de mayor relevancia (Figura 2, Capítulo III, apartado Resultados). De entre estas 1000 variables, 951 variables se correspondieron con el lado magro del músculo *masseter*, perteneciendo las 49 restantes a longitudes de onda correspondientes al lado veteado. De entre estas 1000 variables más relevantes obtenidas de la estimación de la información mutua se llevó a cabo una correlación con los 10 picos observados tras transformar los espectros de reflectancia en absorbancia (Absorbancia = $\text{Log } 1/\text{Reflectancia}$), obteniéndose 10 longitudes de onda relacionadas con los mismos y que presentan el mayor ranking de información mutua.

Fernández-Cabanás et al. (2006) concluyen que los espectros de reflectancia en el rango del visible e infrarrojo cercano de grasa de cerdo están caracterizados por la presencia de picos muy marcados susceptibles a cambios causados por variaciones inesperadas y afirman que la optimización de las derivadas usadas en su estudio son esenciales para la implementación de calibraciones robustas. En nuestro modelo no usamos la tecnología de reflectancia espectral en el rango del visible e infrarrojo cercano para la

cuantificación de características del músculo, sino para una clasificación cualitativa de las muestras contemplando el modelo propuesto por Cen & He (2007) para métodos de reconocimiento de patrones por redes neuronales artificiales. Para no interferir en la capacidad de análisis del algoritmo y no perder información de los espectros, el ranking de información mutua fue obtenido sobre los datos de los espectros en bruto, sin tratamiento o transformación matemática alguno.

Luego se llevó a cabo una caracterización espectro VIS/NIRS cruzando los datos de los espectros obtenidos con la bibliografía científica disponible. En nuestras medidas de reflectancia observamos una clara dominancia de los pigmentos de la carne fresca. Este hecho es debido a que las fibras musculares, miofibrillas, grasa intramuscular junto con el colágeno, coagulación de proteínas en superficie y humedad causan dispersión de la luz (Cozzolino et al., 2003). En todos los casos en este estudio se trabajó sobre piezas musculares completas, es decir, sin trituración de la muestra. Cozzolino et al. (2003) confirman que las estructuras musculares afectan a cómo la luz es atrapada y dispersada desde la muestra y probablemente afecta a la información obtenida de esta cuantificación. Este hecho no es justificación científica suficiente para proceder a la trituración para la cuantificación de las muestras, jugando a su contra las múltiples incompatibilidades para el trabajo rápido y on-line, salvo es casos justificados en donde la elaboración tradicional es en forma de triturados cárnicos, tipo embutido o similar (Ortiz-Somovilla et al., 2007; Ortiz-Somovilla et al., 2005).

Mientras que para el tratamiento informático de los datos por información mutua fueron usados los espectros de reflectancia en bruto, para la caracterización del espectro se ha usado la absorbancia, por ser más fácil de visualizar y ser más usada en la bibliografía. De una forma cualitativa y en base a la bibliografía revisada podemos observar que en la zona visible del espectro existe una banda de absorción a 415 nm asociada con la Banda de Soret. Esta banda es debida a trazas de eritrocitos de la hemoglobina (Brøndum et al., 2000; Cozzolino & Murray, 2004, Cozzolino et al., 2003). Encontramos bandas de absorción a 545 y 577 nm, relacionadas con los pigmentos musculares, más concretamente con los diferentes estados de oxidación de la mioglobina (Ortiz-Somovilla, España-España, De Pedro-Sanz, & Gaitán-Jurado, 2005; Cozzolino

& Murray, 2004, Cozzolino et al., 2003; Ortiz-Somovilla et al., 2007) y correlacionadas por Brøndum et al. (2000) como debidas al mismo fenómeno. Shackelford, Wheeler & Koohmaraie (2004) afirman que en carne de vaca la relación de reflectancia a 610 y 525 nm. Es un indicador del porcentaje de mioglobina que se encuentra en su estado oxidado como oximioglobina. Estos autores aplicaron un análisis de la varianza, encontrando que a 606 nm. menos de la mitad del total de varianza atribuida a la canal es debida al tiempo transcurrido desde el desangrado. Estos autores concluyen que la reflectancia espectral VIS/NIR se pueda usar satisfactoriamente para predecir la calidad de la carne es necesario estandarizar el tiempo de desangrado de la canal. En nuestro estudio, el matadero en donde se realizó el sacrificio de los cerdos objeto de estas investigaciones tiene completamente estandarizado el proceso de sacrificio y desangrado, ya que es el desangrado de los mismos se lleva a cabo inmediatamente tras el aturdimiento del animal y su sacrificio.

Shackelford, Wheeler & Koohmaraie (2004) detectan un pico de reflectancia a 804 nm en el músculo *longissimus thoracis* en muestra con una sonda de reflectancia de alta intensidad. En nuestro estudio usamos una prueba similar de la misma compañía (Analytical Spectral Devices, Inc.), obteniendo tanto para cerdo ibérico como para cerdo blanco un pico de reflectancia entre 795 y 804 nm. Estos mismos autores confirman que la reflectancia no se ve afectada por el tiempo de desangrado a 804 nm., no pudiendo en nuestro caso relacionar esta longitud de onda con alguna característica determinada de la carne.

A 980 nm encontramos un nuevo pico de absorbancia que Ortiz-Somovilla et al. (2007) atribuyen a la transición del espectro de la zona visible al infrarrojo cercano. Este pico es debido a la vibración de los puentes de unión del grupo OH, correlacionado a su vez con la absorbancia a 1450 nm (vibración de grupos OH), ambos debidos al agua (Brøndum et al., 2000; Cozzolino et al., 2003; Hoving-Bolink et al., 2005; Ortiz-Somovilla et al., 2005; Ortiz-Somovilla et al., 2007). Una banda de absorción a 1725 nm fue relacionada con la vibración de los enlaces del grupo CH₂ (Cozzolino & Murray, 2004) y a 1930 nm con la vibración de los enlaces del grupo OH, debido al agua. Para contenido graso y ácidos grasos, donde las uniones CH son un constituyente esencial, diversos autores obtienen bandas a cercanas a 1200, 1400, 1750, 2310 y 2340 nm. Diversos autores (Cozzolino & Murray, 2004; Ortiz-Somovilla et al., 2005; Ortiz-

Somovilla et al., 2007; Hoving-Bolink et al., 2005) obtienen máximos a 1215 y 1210 nm (segundo tono de vibración del grupo CH), confirmando que alrededor de 1200 nm existe información significativa relacionada con la grasa intramuscular, coincidiendo con el máximo a 1210 nm encontrados en nuestro estudio. A 2310 nm se observan combinaciones de vibración de enlaces del grupo CH asociadas con contenido graso y ácidos grasos (Cozzolino et al., 2003; Cozzolino & Murray, 2004).

Por encima de 1800 nm vemos que cruzando los datos de caracterización del espectro VIS/NIR con la información mutua tiene más relevancia los datos de reflectancia espectral del lado veteado, aunque su sumatorio presenta una menor cantidad de información mutua. Está clara la presencia de grasa en el lado veteado del músculo *masseter* y son necesarios estudios más detallados en estas longitudes de onda.

En la Tabla 1 del Capítulo III (apartado de Resultados) se pueden observar las longitudes de onda seleccionadas por información mutua y por caracterización del espectro VIS/NIRS, usadas para llevar a cabo la clasificación mediante redes neuronales artificiales. Enfrentamos los datos derivados de la información mutua (conjunto A) frente a los derivados de la caracterización del espectro (conjunto B) para la clasificación de la raza de cerdo ibérico por redes neuronales artificiales, y en ambos supuestos se realizaron los test utilizando diferentes tamaños para los conjuntos de casos entrenamiento/test del algoritmo (29/1, 28/2, 27/3, 25/5, 26/4 y 20/10). Se llevó a cabo una validación cruzada para cada uno de estos valores. Para todos los conjuntos de entrenamiento/test comentados se han llevado a cabo iteraciones alternativas entre los cerdos blancos e ibéricos, de forma que, por ejemplo, para el conjunto 27/3 se iteraron 2 cerdos blancos y 1 ibérico en la primera iteración, 2 cerdos ibéricos y 1 blanco en la segunda iteración, y así sucesivamente. Para ser lo más equitativos posible y mantener un equilibrio entre las clases de las muestras en los conjuntos, se hizo un baraje previo de los datos tal que la muestra \vec{x}_i era de una clase distinta a las muestras \vec{x}_{i-1} y \vec{x}_{i+1} .

Se aplicaron distintas RBFNNs diseñadas utilizando el algoritmo descrito previamente. La Tabla 1 del Capítulo III (apartado Resultados) contienen la media del porcentaje de acierto en cada ejecución de la validación cruzada

para un tamaño de conjunto de test y el número total de muestras de tipo blanco e ibérico que fueron clasificadas erróneamente. Considerando la variable más relevante de los conjuntos A (información mutua) y B (caracterización del espectro), con longitudes de onda de 500 nm en el primer caso y de 577 nm en el segundo, se puede observar que en ambos supuestos la reflectancia a dichas longitudes de onda es debida al pigmento más importante de la carne: la mioglobina. Podemos observar que el modelo de información mutua (conjunto A) presenta un menor porcentaje de acierto en comparación con el modelo de caracterización del espectro (conjunto B), a pesar de que la cantidad de información mutua es 0,6471 para el modelo de información mutua y 0,6246 para el modelo de caracterización del espectro. Este modelo, a pesar de tener una cantidad de información mutua algo menor, se ajusta mejor a los datos del algoritmo, siendo más relevantes para la red neuronal los valores obtenidos de la bibliografía que los derivados de la información mutua. Los casos clasificados erróneamente para cerdo blanco tienen valor 1 en todos los supuestos de entrenamiento/test, mientras que existe mayor variabilidad para los cerdos ibéricos, en todos los casos más elevada. Esto es debido a que la pureza genética de los cerdos blancos (raza Duroc) es muy alta, siendo todos los individuos muy homogéneos, mientras que para el cerdo ibérico existe mezcla genética de caracteres de la raza Ibérica con la raza Duroc, explicándose así el mayor número de casos errados en la clasificación. Comparando el modelo de información mutua frente al de caracterización del espectro podemos observar que usando una misma red neuronal de clasificación el porcentaje de acierto es mayor para el modelo de caracterización del espectro, realizando una clasificación muy acertada para cerdo ibérico. Debido al bajo número de cerdos del estudio ($n = 30$), los porcentajes de acierto se ven muy influenciados por la ratio n° de casos de entrenamiento/ n° de casos de test, siendo en cualquier caso mucho mejores los resultados obtenidos por el modelo de caracterización del espectro que por el de información mutua, arrojando el primero valores superiores al 90% de acierto para 1 solo valor de longitud de onda al clasificar entre cerdo blanco e ibérico. Resulta evidente que con una sola variable es complicado clasificar entre las dos razas debido a la naturaleza continua de la longitud de onda, ya que la reflectancia a 577 nm. Es debida a la mioglobina y son numerosos los

factores que afectan al estado de oxidación de la misma (Mancini & Hunt, 2005), entre ellos el tipo de envasado. De cualquier forma, a simple vista el consumidor puede hacer una clasificación bastante acertada de la calidad de la carne tras una inspección visual, en donde predomina el color como característica principal.

Cuando usamos 3 variables de entrada para la clasificación por redes neuronales observamos que el porcentaje de acierto es muy alto para los dos modelos ensayados. El modelo de información mutua (conjunto A) presenta un acierto superior al 95% en todos los supuestos de entrenamiento/test, clasificando el cerdo ibérico sin ningún error para las 3 longitudes de onda más relevantes en el ranking de información mutua: 500, 353 y 996. Comparando estas 3 longitudes de onda con el modelo de caracterización del espectro podemos observar que en ninguno de los casos se corresponden con la longitud de onda máxima del pico de absorbancia, aunque dichas longitudes de onda están incluidas dentro 3 picos de absorbancia importantes desde el punto de vista de este modelo: pigmento mioglobina, Banda de Soret y zona de transición entre la zona visible a infrarrojo cercano del espectro. En el conjunto B, como se ha explicado anteriormente, se tomaron las longitudes de onda máximas cercanas a estos mismos puntos seleccionados por la información mutua pero para el modelo de caracterización del espectro: 577, 545 y 414. Con estas 3 longitudes de onda este modelo produce una clasificación peor que el modelo de información mutua, pero mucho más real. Estamos trabajando con picos máximos de longitud de onda basados en la bibliografía, en donde sabemos que esa absorbancia es debida a componentes determinados de la carne. En todos los supuesto de entrenamiento/test excepto en 27/3 y 20/10, en donde obtenemos un acierto de clasificación de 93,33%, encontramos un acierto superior al 95% y una clasificación perfecta de la raza ibérica. Es evidente que el reducido número de individuos estudiados (15 cerdos ibéricos y 15 cerdos blancos) limita mucho los subconjuntos de entrenamiento y test, siendo requerido un nuevo estudio con mayor número de individuos una vez confirmada la utilidad del modelo.

Para el supuesto de 10 variables de entrada observamos que los porcentajes de acierto son mucho menores y muy semejantes para ambos modelos, información mutua y caracterización del espectro. Los cerdos ibéricos errados

son más numerosos que para la red neuronal con 1 y 3 variables de entrada. Este hecho es debido a que la red neuronal no trabaja bien con tantas longitudes de onda, algunas de ellas con una cantidad de información mutua muy baja o incluso nula. Esto sugiere que determinadas longitudes de onda no aportan información relevante a la red neuronal, y por tanto es mejor eliminarlas del sistema. La sumatoria de las cantidades de información para el modelo de información mutua es un 29,02% más elevada que para el modelos de caracterización del espectro, y por tanto los resultados obtenidos para la clasificación son más altos para el modelo de información mutua con 10 variables de entrada, ya que las longitudes de onda seleccionadas por la información mutua presentan un ranking mucho mejor que para el modelo de caracterización del espectro. Derivado de todo lo anterior, podemos afirmar que la red neuronal con 10 variables de entrada trabaja mejor con el modelo de información mutua, ya que los rankings de las variables seleccionadas son mejores.

En la bibliografía revisada no hemos encontrado trabajos sobre reflectancia espectral en el rango visible e infrarrojo cercano del espectro y clasificación por redes neuronales artificiales. El uso de redes neuronales artificiales sí ha sido usado por Chandraratne, Kulasiri & Samarasinghe (2007) para comparar dicha metodología frente a un análisis estadístico por análisis de la función discriminante para predecir la calidad de canales de cordero usando características extraídas de imágenes de chuletas de cordero, demostrando que los resultados muestran una clara superioridad de la red neuronal artificial frente a análisis de la función discriminante para la clasificación usando análisis de imagen.

De forma general podemos afirmar que el número de muestras de ibérico clasificadas erróneamente es superior de cerdos blancos para los 3 supuestos. Aunque en principio se pudiera pensar que este hecho contradice la descripción del algoritmo, en donde se afirma se sitúan los centros de las RBFs dando prioridad a los cerdos ibéricos para hacer una clasificación más precisa de estos, lo que estamos observando es un fenómeno derivado de la mayor mezcla genética de los cerdos ibéricos, ya que tradicionalmente han sufrido cruces con cerdos de raza blanca (Duroc, normalmente) para mejorar sus características productivas y de rentabilidad de canales. Es por ello que existe

una peor clasificación para los cerdos ibéricos, ya que en realidad estamos tratando dos grupos: uno de cerdo blanco puro y otro de cerdo ibérico con diferentes porcentajes de mezcla Duroc x Ibérico. Es necesario un estudio con una población mayor de cerdos y un conocimiento exacto del porcentaje de mezcla entre Duroc e Ibérico para poder evaluar la exactitud de esta tecnología.

Derivado del limitado número de individuos del experimento, a medida que se incrementa el tamaño del conjunto de test, disminuye el porcentaje de acierto en la clasificación. También es posible observar como cuando se utilizan más longitudes de onda para identificar a cada cerdo, los errores aumentan. Esto es bastante lógico puesto que estamos aumentando la dimensionalidad del problema de forma considerable haciendo que el espacio solución crezca exponencialmente. Cuanto más crece el espacio solución, más muestras de entrenamiento son necesarias para identificar los parámetros de la red de modo que ésta pueda hacer una clasificación precisa y por tanto peor funciona nuestro modelo.

BIBLIOGRAFÍA

- Brøndum, J., Munck, L., Henckel, P., Karlsson, A., Tornberg, E., & Engelsen, S.B. (2000). Prediction of water-holding capacity and composition of porcine meat by comparative spectroscopy. *Meat Science*, 55, 177-185.
- Broomhead, D. S., & Lowe, D. (1988). Multivariate functional interpolation and adaptive networks. *Complex Systems*, 2, 321-355.
- Byrne, C.E., Downey, G., Troy, D.J., & Buckley, D.J. (1998). Nondestructive prediction of selected quality attributes of beef by nearinfrared reflectance spectroscopy between 750 and 1098 nm. *Meat Science*, 49, 399–409.
- Cen, H., & He, Y. (2007). Theory and application of near infrared reflectance spectroscopy in determination of food quality. *Trends in Food Science & Technology*, 18, 72-83.
- Chandraratne, M.R., Kulasiri, D., & Samarasinghe, S. (2007). Classification of lamb carcass using machine vision: Comparison of statistical and neural network analyses. *Journal of Food Engineering*, 82, 26-34.
- Cozzolino, D., Barlocco, N., Vadell, A., Ballesteros, F., & Gallieta, G. (2003). The use of visible and near-infrared reflectance spectroscopy to predict colour on both intact and homogenised pork muscle. *LWT – Food Science and Technology*, 36, 195-202.
- Cozzolino, D., & Murray, I. 2004. Identification of animal meat muscles by visible and near infrared reflectance spectroscopy. *LWT – Food Science and Technology*, 37, 447-452.

- Cross, H. R., Gilliland, D. A., Durland, P. R., & Seideman, S. (1983). Beef carcass evaluation by use of a video image analysis system. *Journal of Animal Science*, 57(4), 910-917.
- Fernández-Cabanás, V.M., Garrido-Varo, A., García-Olmo, J., De Pedro, E., & Dardenne, P. (2006). Optimisation of the spectral pre-treatments used for Iberian pig fat NIR calibrations. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 87, 104-112.
- González-Martín, I., González-Pérez, C., Álvarez-García, N., & González-Cabrera, J.M. (2005). On-line determination of fatty acids composition in intramuscular fat of Iberian pork loin by NIRS with a remote reflectance fibre optic probe. *Meat Science*, 69, 243-248.
- Hildrum, K.I., Isaksson, T., Naes, T., Nilsen, B.N., Rodbotten, M., & Lea, P. (1995). Near-infrared reflectance spectroscopy in the prediction of sensory properties of beef. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 3, 81–87.
- Hildrum, K.I., Nilsen, B.N., Mielnik, M., & Naes, T. (1994). Prediction of sensory characteristics of beef by near-infrared spectroscopy. *Meat Science*, 38, 67–80.
- 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., & Lambooij, en E. (2005). Perspective of NIRS measurements early post mortem for prediction of pork quality. *Meat Science*, 69, 417-423.
- Josell, A., Martinsson, L., Borggaard, C., Andersen, J. R., & Tornberg, E. (2000). Determination of RN⁻ phenotype in pigs at slaughter-line using visual and near-infrared spectroscopy. *Meat Science*, 55, 273-278.
- Kalaria, R.N., & Pax, A.B. (1995) Increased collagen content of cerebral microvessels in Alzheimer's disease. *Brain Research*, 705, 349-352.

- Kittler, J., & Illingworth, J. (1986). Minimum error thresholding. *Pattern Recogn*, 19, 41-47.
- Kurita, T., Otsu, N., & Abdelmalek, N. (1992). Maximum likelihood thresholding based on population mixture models. *Pattern Recogn*, 25, 1231-1240.
- Lepetit, J., & Culioli, J. (1994). Mechanical properties of meat. *Meat Science*, 36, 203-237.
- Li, J., Tan, J., Martz, F., & Heymann, H. (1999). Image texture feature as indicators of beef tenderness. *Meat Science*, 53, 17-22.
- Li, J., Tan, J., & Shatadal, P. (2001). Classification of tough and tender beef by image texture analysis. *Meat Science*, 57, 341-346.
- Liu, Y., Lyon, B.G., Windham, W.R., Realini, C.E., Pringle, T.D., & Duckett, S. (2003). Prediction of color, texture, and sensory characteristics of beef steaks by visible and near-infrared reflectance spectroscopy. A feasibility study. *Meat Science*, 65, 1107–1115.
- Mancini, R. A., & Hunt, M. C. (2005). Current research in meat color. *Meat Science*, 71, 100-121.
- Masseroli, M., Caballero, T., O'Valle, F., Del Moral, R.M., Pérez-Milena, A., Del Moral, R.G. (2000) Automatic quantification of liver fibrosis: design and validation of a new image analysis method: comparison with semi-quantitative indexes of fibrosis. *Journal of Hepatology*, 32(3), 453-64.
- Masseroli, M., O'Valle, F., Andújar, M., Ramírez, C., Gómez-Morales, M., de Dios Luna, J., Aguilar, M., Aguilar, D., Rodríguez-Puyol, M., Del Moral, R.G. (1998). Design and validation of a new image analysis method for automatic quantification of interstitial fibrosis and glomerular morphometry. *Laboratory Investigation*, 78(5), 511-22.

- Naes, T., & Hildrum, K.I. (1997). Comparison of multivariate calibration and discriminant analysis in evaluating NIR spectroscopy for determination of meat tenderness. *Applied Spectroscopy*, 51, 350–357.
- Nakamura, Y.N., Iwamoto, H., Ono, Y., Shiba, N., Nishimura, S., & Tabata, S. (2003). Relationship among collagen amount, distribution and architecture in the *M. longissimus thoracis* and *M. pectoralis profundus* from pigs. *Meat Science*, 64, 43-50.
- Nicoletti, A., Heudes, D., Mandet, C., Hinglais, N., Bariety, J., & Michel, J.B. (1996) Inflammatory cells and myocardial fibrosis: spatial and temporal distribution in renovascular hypertensive rats. *Cardiovascular Research*, Volume 32, Issue 6, 1096-1107.
- Ortiz-Somovilla, V., España-España, F., De Pedro-Sanz, E.J., & Gaitán-Jurado, A.J. (2005). Meat mixture detection in Iberian pork sausages. *Meat Science*, 71, 490-497.
- 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.
- Park, B., Chen, Y. R., Hruschka, W. R., Shackelford, S. D., & Koohmaraie, M. (1998). Near-infrared reflectance analysis for predicting beef longissimus tenderness. *Journal of Animal Science*, 76, 2115–2120.
- Purslow, P.P. (2005). Intramuscular connective tissue and its role in meat quality – Review. *Meat Science*, 70, 435-447.
- Savenije, B., Geesink, G.H., van der Palen, J.G.P., & Hemke, G. (2006). Prediction of pork quality using visible/near-infrared reflectance spectroscopy. *Meat Science*, 73, 181-184.

- Shackelford, S.D., Wheeler, T.L., & Koohmaraie, M. (2004). Development of optimal protocol for visible and near-infrared reflectance spectroscopy evaluation of meat quality. *Meat Science*, 68, 371-381.
- Shackelford, S.D., Wheeler, T.L., & Koohmaraie, M. (2005). On-line classification of US Select beef carcasses for *longissimus* tenderness using visible and near-infrared reflectance spectroscopy. *Meat Science*, 69, 409-415.
- Sifre, L., Berge, P., Engel, E., Martin, J.F., Bonny, J.M., Listrat, A., Taylor, R., & Culioli, J. (2005). Influence of the spatial organization of the perimysium on beef tenderness. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 8390-8399.
- Sifre-Maunier, L., Taylor, R.G., Berge, P., Culioli, J., & Bonny, J.M. (2006). A global unimodal thresholding based on probabilistic reference maps for the segmentation of muscle images. *Image and Vision Computing*, 24, 1080-1089.
- Tan, J. (2004). Meat quality evaluation by computer vision. *Journal of Food Engineering*, 61, 27-35.
- Torrescano, G., Sánchez-Escalante, A., Giménez, B., Roncales, P., & Beltrán, J.A. (2003). Shear values of raw samples of 14 bovine muscles and their relation to muscle collagen characteristics. *Meat Science*, 64, 84-91.
- Wheeler, T.L., Vote, D., Leheska J.M., Shackelford, S.D., Belk, K.E., Wulf, D.M., Gwartney; B.L., & Koohmaraie, M. (2002). The efficacy of three objective systems for identifying beef cuts that can be guaranteed tender. *Journal of Animal Science*, 80, 3315-3327.

6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

6.1. CONCLUSIONES.

1. Las técnicas de morfometría y visión artificial diseñadas en esta tesis doctoral son capaces de realizar una cuantificación objetiva y reproducible de la distribución y porcentaje de tejido conectivo intramuscular, perimio y retracción de fibras musculares en carnes de diferentes especies animales, que muestran proporciones de todas ellas diferenciables estadísticamente.

2. El porcentaje de área ocupada por tejido conectivo intramuscular es cuatro veces mayor en el cerdo ibérico en comparación con el cerdo blanco, existiendo por tanto diferencias estadísticamente significativas entre las dos razas de cerdo estudiadas.

3. Las técnicas de reflectancia espectral en el rango del visible e infrarrojo cercano puestas a punto son capaces de llevar a cabo determinaciones cualitativas en cuanto a grupos moleculares presentes en la carne de cerdo, incluyendo entre ellos mioglobina, agua, proteínas y grasa.

4. El lado magro del músculo *masseter* presenta una mayor cantidad de información mutua que el lado veteado, debido a la presencia en éste de un extenso fenómeno de veteado, lo que origina un alto error de muestreo a la hora de tomar los espectros de reflectancia.

5. La tecnología de reflectancia espectral en el rango del visible e infrarrojo cercano aplicada conjuntamente con algoritmos de información mutua y redes neuronales artificiales es capaz de llevar a cabo la clasificación diferencial entre las razas de cerdo blanco e ibérico con un alto grado de acierto, posicionando correctamente en algunos modelos más del 95% de las muestras estudiadas.

6. De las 3 redes neuronales de función de base radial ensayadas, la basada en el algoritmo de clústering difuso-probabilístico para aproximación funcional clasifica con más aciertos los cerdos blancos e ibéricos, frente a las redes neuronales basadas en el algoritmo de las C-medias difuso y en máquinas de vectores de soporte.

7. Para el supuesto de 1 variable de entrada al sistema, el modelo de caracterización del espectro genera una clasificación más acertada de las razas blanca e ibérica, con muy pocos cerdos ibéricos clasificados erróneamente.

8. Para el supuesto de 3 variables de entrada al sistema, el modelo de información mutua es capaz de llevar a cabo una clasificación de las razas blanca e ibérica prácticamente perfecta, obteniéndose para el modelo de caracterización del espectro valores de acierto muy elevados.

9. Para el supuesto de 10 variables de entrada al sistema, tanto el modelo de información mutua como el de caracterización del espectro obtienen unas clasificaciones menos acertadas, debido a las interferencias generadas por las longitudes de onda con poca cantidad de información mutua y al hecho de que al aumentar la dimensionalidad del problema (más variables de entrada) aumenta exponencialmente el espacio solución del mismo.

6.2. PERSPECTIVAS.

El estudio desarrollado en la presente tesis doctoral se encuentra actualmente en una fase más avanzada dentro del proyecto “Mejora de la calidad gastronómica de la carne de cerdo ibérico: estudio textural, fisicoquímico, histológico y culinario”. En este caso se están llevando a cabo las determinaciones sobre 66 animales de la raza ibérica aplicando las técnicas ya comentadas de morfometría, reflectancia espectral en el rango del visible y del infrarrojo cercano y redes neuronales artificiales con la finalidad de identificar la pureza genética del fenotipo ibérico expresado en los animales.

A su vez se están llevando a cabo sobre estas mismas muestras diferentes tratamientos térmicos para el cocinado de las mismas a 94°C y 75°C durante 2 horas y 45 minutos en baño termometrado Roner.

Todas las muestras, tanto frescas como cocinadas, se han procesado para llevar a cabo morfometría, y además se ha llevado a cabo la cuantificación de la reflectancia espectral en el rango del visible e infrarrojo cercano. A su vez se han llevado a cabo determinaciones de texturometría siguiendo el protocolo de Warner-Bratzler, tanto en muestras frescas como cocinadas, con la finalidad de estudiar la evolución del tejido conectivo intramuscular frente al binomio tiempo-temperatura y la transformación de colágeno en gelatina mediada por el calor. Sobre las muestras cocinadas se llevó a cabo un proceso de cata ciega para correlacionar los datos con todos los demás resultados derivados de este proyecto, el cual se encuentra en fase de tabulación, análisis estadístico y formulación de los resultados.

7. ANEXOS

7. ANEXOS.

ARTÍCULOS PUBLICADOS EN RELACIÓN A ESTA TESIS DOCTORAL.

7.1. “Permeability and mass transfer as a function of the cooking temperature during the frying of beefburgers” by Orosvári, B.K., Rocha, C.S., Sjöholm, I., & Tornberg, E. [Journal of Food Engineering, 75 (2006), 1-12].

F.G. del Moral, F. O’Valle & R.G. del Moral.

Publicado en **Journal of Food Engineering**, 80, 374-376 (2007).

7.2. Image analysis application for automatic quantification of intramuscular connective tissue in meat.

F.G. del Moral, F. O'Valle, M. Masseroli, & R.G. del Moral.

Publicado en **Journal of Food Engineering**, 81, 33-41 (2007).

7.3. Duroc and Iberian Pork Neural Network Classification by Visible and Near Infrared Reflectance Spectroscopy.

F.G. del Moral, A. Guillén, L.G. del Moral, F. O'Valle, L. Martínez, & R.G. del Moral.

Enviado para publicación a **Journal of Food Engineering**.