

VNiVERSiDAD D SALAMANCA

ESCUELA POLITÉCNICA SUPERIOR DE ZAMORA
DEPARTAMENTO DE CONSTRUCCIÓN Y AGRONOMÍA



TESIS DOCTORAL

**APLICACIÓN DE TÉCNICAS NO DESTRUCTIVAS PARA LA
DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS DE CALIDAD Y
CLASIFICACIÓN DE CANALES DE CERDO IBÉRICO**

**APPLICATION OF NON-DESTRUCTIVE TECHNIQUES FOR THE
DETERMINATION OF QUALITY PARAMETERS AND
CLASSIFICATION OF IBERIAN PIG CARCASSES**

Miriam Hernández Jiménez
Zamora, España 2023

BAJO LA DIRECCIÓN DE LAS DOCTORAS
Isabel Revilla Martín y Ana María Vivar Quintana

D/D^a. **Miriam Hernández Jiménez** con DNI **70.828.477-T** matriculado en el Programa de Doctorado en **Ciencia y Tecnología Químicas** de la Universidad de Salamanca,

SOLICITA

La autorización de la Comisión Académica para la presentación de la **Tesis Doctoral** con título "**Aplicación de Técnicas no destructivas para la determinación de parámetros de calidad y clasificación de canales de cerdo ibérico**" en formato de **compendio de artículos/publicaciones** (Comisión de Doctorado y Posgrado de la Universidad de Salamanca, 15 de febrero de 2013). Se adjunta a esta solicitud la autorización de las directoras de la Tesis Doctoral.

El listado de las publicaciones que se van a aportar a la Tesis en dicho formato son los siguientes:

Artículo 1: Prediction of stable isotopes and fatty acids in subcutaneous fat of Iberian pigs by means of NIR: A comparison between benchtop and portable systems.

Revista: Talanta, 224, 121817 (2021).

Autores: González-Martín, M. I., Escuredo, O., Hernández-Jiménez, M., Revilla, I., Vivar-Quintana, A. M., Martínez-Martín, I., y Hernández-Ramos, P.

<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121817>

Índices de Calidad: Q1 11/87, Chemistry, Analytical. Factor de impacto: 6.556 (2021)

Artículo 2: Carbon stable isotopes, fatty acids and the use of NIRS to differentiate IBERIAN pigs.

Revista: Meat Science, 182, 108619 (2021).

Autores: Hernández-Jiménez, M., González-Martín, M. I., Martínez-Martín, I., Revilla, I., & Vivar-Quintana, A. M.

<https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2021.108619>

Índices de Calidad: Q1 16/144, Food Science and Technology. Factor de impacto: 7.077 (2021)

Artículo 3: Authentication of the Montanera Period on Carcasses of Iberian Pigs by Using Analytical Techniques and Chemometric Analyses.

Revista: Animals, 11(9), 2671 (2021).

Autores: Hernández-Jiménez, M., Revilla, I., Arce, L., Cardador, M. J., Ríos-Reina, R., González-Martín, I., & Vivar-Quintana, A. M.

<https://doi.org/10.3390/ani11092671>

Índices de Calidad: Q1 13/62, Agriculture, Dairy and Animal Science. Factor de impacto: 3.231 (2021)

Zamora, a 13 de marzo de 2023.

HERNANDEZ
JIMENEZ MIRIAM
- 70828477T


Firmado digitalmente por
HERNANDEZ JIMENEZ
MIRIAM - 70828477T
Fecha: 2023.03.13
11:37:02 +01'00'

**ANA MARIA VIVAR QUINTANA E ISABEL REVILLA MARTÍN,
CATEDRÁTICAS DE UNIVERSIDAD, PERTENECIENTES AL
DEPARTAMENTO DE CONSTRUCCIÓN Y AGRONOMÍA DE LA
UNIVERSIDAD DE SALAMANCA,**

HACEN CONSTAR QUE:

La tesis doctoral titulada “**Aplicación de Técnicas no destructivas para la determinación de parámetros de calidad y clasificación de canales de cerdo ibérico**” ha sido realizada por D. Miriam Hernández Jiménez bajo nuestra dirección para optar al título de doctor por la Universidad de Salamanca. Cumpliéndose todos los requisitos recogidos en la normativa correspondiente, damos nuestra conformidad para que sea presentada y defendida bajo el formato de Compendio de Artículos.

Zamora, 11 de marzo de 2023



Firmado
digitalmente por
VIVAR QUINTANA
ANA MARIA -
13134588R
Fecha: 2023.03.11
11:48:11 +01'00'

REVILLA
MARTIN
ISABEL -
1314021
0B

Firmado
digitalmente
por REVILLA
MARTIN ISABEL
- 13140210B
Fecha:
2023.03.13
10:36:48
+01'00'

EJECUCIÓN DE ACUERDOS

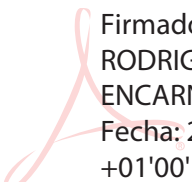
La Comisión Académica del **Programa de Doctorado en Ciencia y Tecnología Químicas** reunida en sesión ordinaria virtual el día 14 de marzo de 2023,

ACORDÓ

AUTORIZAR la presentación de Tesis Doctoral por compendio de artículos solicitada por D^a. MIRIAM HERNÁNDEZ JIMÉNEZ por cumplir la normativa de la Universidad de Salamanca *“Procedimiento para la presentación de la Tesis Doctoral en la Universidad de Salamanca en el formato de compendio de artículos/publicaciones, aprobado por la Comisión de Doctorado y Postgrado, 15 de febrero de 2013”*.

Salamanca, 14 de marzo de 2023.

RODRIGUEZ
GONZALO
ENCARNACION -
00793145J



Firmado digitalmente por
RODRIGUEZ GONZALO
ENCARNACION - 00793145J
Fecha: 2023.03.14 08:54:04
+01'00'

Fdo: Encarnación Rodríguez Gonzalo
COORDINADORA DEL PROGRAMA DE DOCTORADO

AGRADECIMIENTOS

Me enfrento a escribir el último apartado de esta Tesis, y no precisamente es el más fácil para mí.

En él quiero expresar mi agradecimiento a todas esas personas que me han rodeado durante esta carrera de fondo y me han tenido que sufrir un poco, sobre todo en la última etapa.

En primer lugar, tengo que mencionar a Isabel Revilla por darme la oportunidad de llevar a cabo una tesis doctoral y por formar parte del grupo de investigación, haciéndome sentir uno más del grupo desde el primer día.

Detrás de esta tesis hay un gran esfuerzo por parte de las directoras Isabel Revilla y Ana Vivar. Quiero daros las gracias por vuestra disposición, por compartir vuestros conocimientos, por vuestra paciencia y por el apoyo que me habéis dado día tras día. Me enorgullece también haber podido compartir a vuestro lado la reciente meta que habéis conseguido, la cátedra.

Para el resto de los miembros del equipo de investigación no me faltan palabras de agradecimiento. Inma, Iván y Pedro, gracias porque siempre estáis dispuestos a ayudar y aportar conocimiento y consejos. También agradezco a los profesores de la EPSZ que han contado conmigo para colaborar en sus proyectos.

Gracias a Marisol, por su apoyo, ayuda y consejos. No me olvido de los técnicos de laboratorio de otras áreas y del personal PAS, que siempre han estado haciendo frente a los problemas técnicos que han ido surgiendo. También merecen mención todas las personas que han estado de paso por el laboratorio y siempre han tenido palabras de ánimo y momentos para compartir, llegando a crear grandes amistades.

Tengo palabras de reconocimiento para la Universidad de Salamanca por el contrato Predoctoral y por financiar, junto con la Diputación de Salamanca, el proyecto con el que comencé la carrera investigadora. También a Carrasco Ibéricos y al personal de la empresa que tanto me ha facilitado el trabajo para la toma de muestras en matadero y secadero.

Para las diferentes instituciones en las que he tenido oportunidad de desplazarme presencialmente, esquivando la COVID 19, entre ellos está el Servicio Central de Apoyo a la Investigación (SCAI) y el Departamento de Química Analítica, ambos de la Universidad de Córdoba y al Institut für Analytische Chemie und Radiochemie de la Universidad de Innsbruck (Austria).

Y para mis amigas, porque siempre me han intentado comprender y han estado a mi lado en todo momento, teniendo que aceptar mi ausencia en alguna ocasión con la excusa de la tesis.

Por último y no menos importante agradezco infinitamente a mi familia, por su plena confianza desde el primer momento, su apoyo incondicional durante todos estos años y por hacerme sentir tan cerca a pesar de la larga distancia que nos ha podido separar. No puedo dejar de mencionar a las personas que hoy no me pueden acompañar y las que más orgullo sentirían en este momento, gracias Yaya y Yayo por los valores de esfuerzo, constancia y respeto que nos habéis inculcado desde pequeños.

“Las profundidades del mar son solo agua después de todo”.

(Virginia Woolf)

ÍNDICE / INDEX

ACRÓNIMOS Y SIGLAS.....	13
I. RESUMEN / SUMMARY.....	16
II. HIPÓTESIS DE PARTIDA Y OBJETIVOS / STARTING HYPOTHESIS AND OBJECTIVES.....	21
III. INTRODUCCIÓN.....	26
1. EL CERDO IBÉRICO.....	27
1.1. La raza porcina ibérica.....	27
1.2. El sector porcino en España.....	31
1.3. Figuras de calidad en productos ibéricos.....	33
2. EL CERDO IBÉRICO COMO MATERIA PRIMA.....	38
2.1. Ciclo productivo.....	38
2.2. Concepto de calidad de la carne de cerdo ibérico.....	39
2.2.1. Calidad productiva.....	39
2.2.2. Calidad tecnológica.....	40
2.2.3. Calidad sensorial.....	40
2.2.4. Calidad higiénico-sanitaria y nutricional.....	40
2.3. Factores que influyen sobre la calidad del cerdo ibérico.....	41
2.3.1. Raza.....	41
2.3.2. Sexo y castración.....	42
2.3.3. Edad y peso al sacrificio.....	44
2.3.4. Ejercicio físico.....	45
2.3.5. Sistema de producción y alimentación.....	45
2.3.6. Manejo pre-sacrificio y post-sacrificio.....	49
3. MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA AUTENTICIDAD DEL GENOTIPO Y RÉGIMEN ALIMENTICIO EN EL CERDO IBÉRICO.....	50
3.1. Métodos basados en las propiedades físicas de la grasa.....	50
3.1.1. Sensación al tacto.....	50
3.1.2. Punto de fusión.....	51
3.1.3. Índice de yodo.....	51

3.1.4.	Otros métodos.....	52
3.2.	Características químicas de la grasa.....	52
3.2.1.	Determinación de ácidos grasos.....	52
3.2.2.	Triglicéridos en grasa.....	54
3.2.3.	Análisis de la fracción insaponificable de la grasa.....	55
3.2.4.	Análisis de isótopos de carbono ($\delta^{13}\text{C}$)	56
3.3.	Determinación de compuestos volátiles.....	62
3.3.1.	Análisis de compuestos volátiles.....	62
3.3.2.	Análisis mediante olfatometría electrónica.....	62
3.3.3.	Espectrometría de movilidad iónica.....	63
3.4.	Técnicas no destructivas y/o en línea.....	66
3.4.1.	Análisis por ultrasonidos.....	66
3.4.2.	Análisis de imágenes.....	67
4.	ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO.....	68
4.1.	Fundamentos de la espectroscopía infrarroja.....	68
4.2.	Interacción materia-radiación.....	73
4.3.	Interpretación espectral NIR.....	74
4.4.	Instrumentación.....	75
4.5.	Ventajas e inconvenientes de la espectroscopía NIR.....	81
4.6.	Aplicaciones de la tecnología NIR en el sector del cerdo ibérico.....	82
5.	QUIMIOMETRÍA.....	85
5.1.	Etapas del proceso de modelado NIRS.....	85
5.1.1.	Muestreo y selección del conjunto de calibración.....	86
5.1.2.	Métodos de referencia.....	86
5.1.3.	Pretratamientos espectrales.....	86
5.1.4.	Métodos para reducir el número de variables iniciales.....	88
5.2.	Análisis cuantitativos.....	90
5.3.	Análisis cualitativo.....	95
IV.	BIBLIOGRAFÍA / BIBLIOGRAPHY.....	102

V. COMPENDIO DE ARTÍCULOS / COMPENDIUM OF ARTICLES128

ARTICLE 1. Prediction of stable isotopes and fatty acids in subcutaneous fat of Iberian pigs by means of NIR: A comparison between benchtop and portable systems.....129

ARTICLE 2. Carbon stable isotopes, fatty acids and the use of NIRS to differentiate IBERIAN pigs.....144

ARTICLE 3. Authentication of the Montanera Period on Carcasses of Iberian Pigs by Using Analytical Techniques and Chemometric Analyses.....159

VI. CONCLUSIONES / CONCLUSIONS.....178

ÍNDICE DE FIGURAS / INDEX OF FIGURES

Figura 1: Estirpe Retinta.....	27
Figura 2: Estirpe Lampiño.....	28
Figura 3: Estirpe Entrepelado.....	28
Figura 4: Estirpe Torbiscal.....	28
Figura 5: Mapa de las áreas de dehesa en España.....	30
Figura 6: Porcentaje del número de precintos colocados en cada año a piezas de jamón y paleta con la identificación de la Norma de cerdo ibérico (RD 4/2014). (Fuente: Asociación Interprofesional del Cerdo Ibérico	32
Figura 7: Precintos según las denominaciones de venta de productos acogidos a la actual Norma del cerdo ibérico (Real Decreto 4/2014, de 10 de enero).....	36
Figura 8: Cerdos ibéricos pastando en la dehesa.....	39
Figura 9: Esquema de trabajo de un Espectrómetro de Masas de Relaciones Isotópicas (IRMS).....	58
Figura 10: Histograma de la proporción de isótopos de Carbono de plantas.....	59
Figura 11: Cuantificación de las arrobas de bellota recibidas por los cerdos a partir del análisis del isótopo $\delta^{13}\text{C}$ (‰).....	61
Figura 12: Esquema del equipo GC-IMS empleado en el presente estudio.....	64
Figura 13: Espectros GC-IMS.....	65
Figura 14: Regiones del espectro electromagnético.....	69
Figura 15: Modos de vibración moleculares en la región NIR.....	70
Figura 16: Cuantificación energética molecular.....	71
Figura 17: Diagrama de energía potencial y niveles energéticos. Osciladores armónicos e inarmónicos.....	72
Figura 18: Fenómenos de interacción radiación-materia.....	74
Figura 19: (a): Asignación de las bandas de absorción en la región NIR. (b): Características generales de un espectro NIR.....	75
Figura 20: Equipos NIRS. Imagen de la derecha equipo Foss NIRS System 5000 e imagen de la izquierda equipo MicroNIR™ 1700	76
Figura 21: Esquema que representa los distintos modos de análisis NIRS. A) Reflectancia, B) Transmitancia, C) Transflectancia y D) Interactancia.....	78
Figura 22: Esquema del equipo Foss NIRS System 5000 para registros con sonda de fibra óptica. Modo de análisis interactancia.....	80

Figura 23: Esquema del equipo Foss NIRS System 5000 para registros de muestras líquidas con capsulas cam-lock. Modo de análisis transflectancia.....	80
Figura 24: Esquema del equipo portátil MicroNIR 1700.	81
Figura 25: Diagrama de las etapas básicas para el desarrollo de un modelo de calibración NIRS.....	85
Figura 26: Descomposición de un conjunto de espectros mediante análisis de componentes principales	89
Figura 27: Clasificación general de los métodos de calibración.....	90
Figura 28: Esquema general de obtención de modelos PLS.....	92
Figura 29: Esquema del proceso de validación cruzada.....	93
Figura 30: Clasificación general de métodos de reconocimiento de pautas supervisadas.....	96
Figura 31: Pasos básicos para el algoritmo k-NN. a) cálculo de distancias. b) localizar los vecinos más cercanos. c) votar por las etiquetas.....	98
Figura 32: Análisis Discriminante Lineal (LDA). Separación entre clases.....	99
Figura 33: Primer componente del PLS. La dirección que toma es aquella que maximiza la covarianza entre la matriz X y la variable “y”	100
Figura 34: Discriminación en dos grupos (puntos rojos y negros). La recta verde representa la dirección que mayor separación logra. Los puntos amarillos en el centro de las elipses representan la media.....	101

ACRÓNIMOS Y SIGLAS / ACRONYMS AND ABBREVIATIONS

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

AGI: Ácidos Grasos Insaturados (*Unsaturated Fatty Acids*)

AGM: Ácidos Grasos Monoinsaturados (*Monounsaturated Fatty Acids*)

AGP: Ácidos Grasos Poliinsaturados (*Polyunsaturated Fatty Acids*)

AGS: Ácidos Grasos Saturados (*Saturated Fatty Acids*)

ANN: Redes Neuronales Artificiales (*Artificial Neural Networks*)

AOAC: Asociación Oficial de Químicos Analistas (*Association of Official Agricultural Chemists*)

AOTF: Filtros Sintonizables Acústico-Ópticos (*Acusto-Optic Tunable Filter*)

APPCC: Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (*Hazard Analysis and Critical Control Points*)

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

BIAS: Media de los Residuales (*Mean of the Residuals*)

C₃: Ciclo de Calvin (*Calvin Cycle*)

C₄: Ciclo de Hatch y Slack (*Hatch and Slack Cycle*)

DFD: Oscuras, Firmes y Secas (*Dark purplish red, Firm and Dry*)

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

DSC: Calorimetría Diferencial de Barrido (*Differential scanning calorimetry*)

DT: Corrección de la Tendencia (*Detrending*)

Em: Energía de la Molécula (*Energy of the molecule*)

EmT: Energía Molecular Total (*Total Molecular Energy*)

EUROSTAT: Oficina Europea de Estadística (*European Statistical Office*)

FIR: Infrarrojo Lejano (*Far InfraRed*)

FT: Transformada de Fourier (*Fourier Transform*)

GaAs: Arseniuro de Galio (*Gallium Arsenide*)

GC: Cromatografía de Gases (*Gas Chromatography*)

GC-IMS: Cromatografía de Gases acoplada a la Espectrometría de Movilidad Iónica (*Gas Chromatography coupled with Ion Mobility Spectrometry*)

GIRMS: Espectrometría de Masas de Relación Isotópica (*Gas Isotope Ratio Mass Spectrometry*)

GMD: Ganancia Media Diaria (*Average Daily Gain*)

H: Distancia de Mahalanobis (*Mahalanobis Distance*)

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

IMS: Espectrometría de Movilidad de Iones (*Ion Mobility Spectrometry*)

InGaAs: Arseniuro de Indio y Galio (*Indium Gallium Arsenide*)

IRMS: Espectrómetro de Masas por Relación de Isótopos (*Isotope Ratio Mass Spectrometer*)

k-NN: k - Vecinos más Cercanos (*k - Nearest Neighbors*)

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

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

LVF: Filtro Lineales Variables (*Linear Variable Filters*)

MAPA: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (*Ministry of Agriculture, Fisheries and Food*)

MIR: Infrarrojo Medio (*Mid-Infrared*)

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

MS: Espectrometría de Masas (*Mass Spectrometry*)

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

NGMS: Espectrometría de Masas de Gases Nobles (*Noble Gas Mass Spectrometry*)

NH: Distancia de Vecinos (*Neighboring Distance*)

NIPALS: Mínimos Cuadrados Incrementales Iterativos no Lineales (*Nonlinear Iterative Partial Least Squares*)

NIR: Infrarrojo cercano (*Near Infrared*)

NIRS: Espectroscopía del Infrarrojo Cercano (*Near Infrared Spectroscopy*)

OPLS-DA: Análisis Discriminante por Proyección sobre Estructuras Latentes Ortogonales (*Projection on Orthogonal Latent Structures Discriminant Analysis*)

PCA: Análisis de Componentes Principales (*Principal Component Analysis*)

PC: Componente Principal (*Principal Component*)

PLS: Mínimos Cuadrados Parciales (*Partial Least Squares*)

PLS-DA: Análisis Discriminante por Mínimos Cuadrados Parciales (*Partial Least Squares - Discriminant Analysis*)

PRM: Métodos de Reconocimiento de Pautas (*Pattern Recognition Methods*)

PSE: Pálida, Blanda y Exudativa (*Pale, Soft and Exudative*)

- R:** Reflectancia Relativa (*Relative Reflectance*)
- RD:** Real Decreto (*Royal Decree*)
- RGB:** Sistema de composición de colores primarios (*Red, Green, Blue*)
- RM:** Resonancia Magnética (*Magnetic resonance*)
- RMI:** Resonancia Magnética de Imagen (*Magnetic Resonance Imaging*)
- RMSE:** Raíz Media Cuadrática del Error Típico (*Root Mean Square Error*)
- RMS-X Residuals:** Raíz Cuadrada de la Media Cuadrática Residual (*Square Root of the Residual Root Mean Square*)
- RPD:** Desviación Residual Predictiva (*Residual Predictive Deviation*)
- RSQ:** Coeficiente de Correlación Múltiple (*Multiple Correlation Coefficient*)
- SD:** Desviación Estándar (*Standard Deviation*)
- SEC:** Error Estándar de Calibración (*Standard Error of Calibration*)
- SECV:** Error Estándar de Validación Cruzada (*Standard Error of Cross Validation*)
- SEP:** Error Estándar de Predicción (*Standard Error of Prediction*)
- SEP(C):** Error Estándar de Predicción Corregido para el Sesgo (*Standard Error of Prediction Corrected for Bias*)
- SG:** Subdirección General (*General Subdirectorate*)
- SIGPAC:** Sistema de Información Geográfica de Parcelas Agrícolas (*Geographic Information System for Agricultural Plots*)
- SIMCA:** Modelado Independiente Suave de Analogía de Clases (*Smooth Independent Modeling of Class Analogy*)
- SNV:** Tipificación de la absorbancia (*Standard Normal Variate*)
- SIRMS:** Espectrometría de Masas de Relaciones Isotópicas (*Stable Isotope Ratio Mass Spectrometry*)
- T:** Transmitancia (*Transmittance*)
- TIMS:** Espectrometría de Masas de Ionización Térmica (*Thermal Ionisation Mass Spectrometry*)
- UE:** Unión Europea (*European Union*)
- USDA:** Departamento de agricultura de Estados Unidos (*United State Department of Agriculture*)
- XRD:** Difracción de Rayos X (*X-Ray Diffraction Analysis*)

I. RESUMEN / SUMMARY

RESUMEN

El cerdo ibérico es una raza autóctona ligada al ecosistema de la dehesa, localizada en el sureste de la Península Ibérica y reconocida por la destacable calidad organoléptica de los productos derivados. La alta demanda de productos ibéricos, junto con una limitada producción de animales cebados en regímenes extensivos alimentados a base de bellota y pasto (montanera), ha dado lugar a la cría de animales en regímenes intensivos y al empleo de cruces con razas mejorantes. La calidad final de la carne de estos animales, y de sus productos derivados, está fuertemente relacionada con diferentes factores como la producción animal, la raza, la alimentación, la edad o el peso en el momento del sacrificio. Son diversos los métodos analíticos que han sido estudiados y aplicados de cara a poder garantizar la autenticidad de la raza y la alimentación suministrada al animal, sin embargo, en el momento actual no existe ningún método analítico oficial.

La espectroscopia de infrarrojo cercano (NIR) es una herramienta multiparamétrica que ha sido ampliamente empleada para evaluar características de la carne y calidad de los productos cárnicos. En el sector ibérico, la tecnología NIR ha sido aplicada para la cuantificación de los contenidos en proteína, grasa y humedad, para la predicción del perfil en ácidos grasos y de la dieta del cerdo durante el proceso de engorde. Esta metodología analítica permite obtener los resultados de forma inmediata, individualizada, no destructiva y respetuosa con el medio ambiente. Sin embargo, la interpretación de los espectros obtenidos mediante su aplicación requiere ser complementada con complejos métodos quimiométricos.

En esta tesis se propone el uso de la tecnología NIRS con el fin de predecir parámetros determinantes de la calidad de la grasa en cerdo ibérico como el perfil lipídico y la relación isotópica de Carbono ($\delta^{13}\text{C}$). Se aborda así mismo la aplicación de la tecnología NIRS y la espectrometría de movilidad iónica acoplada a la cromatografía de gases (GC-IMS) con fines de clasificación/autenticación. Finalmente, la tesis analiza la viabilidad del uso de equipos portátiles, que facilitan el trabajo en campo, y que han experimentado un claro auge en los últimos años.

En el primer artículo incluido en la presente tesis, se estudió la posibilidad de predecir la composición del perfil de ácidos grasos y el valor de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) en grasa subcutánea intacta usando un equipo NIRS portátil. Los resultados se compararon con los obtenidos aplicando el equipo NIRS de sobremesa tanto en grasa fundida como intacta.

En el segundo de los artículos se evalúan los cambios en el perfil lipídico de la grasa y en la relación isotópica de carbono, antes y después de la fase de cebo en montanera, analizándose así mismo la influencia de diferentes tiempos de permanencia en montanera. La existencia de correlaciones entre el isótopo $\delta^{13}\text{C}$ (‰) y el perfil lipídico también ha sido estudiada con el fin de poder clasificar el producto en función de la alimentación animal.

El tercer artículo evalúa el potencial de clasificación de la tecnología NIRS frente a GC-IMS, en grasa subcutánea, en el momento del sacrificio. El objetivo que se persigue es la clasificación en función de la raza de los animales y los días que han permanecido alimentándose en régimen de montanera.

Las conclusiones que derivan de los estudios realizados señalan que la utilización de la espectroscopia NIR, tanto con equipos de sobremesa como portátiles, resulta adecuada para predecir parámetros de calidad en la grasa de cerdo ibérico. Esta tecnología podría reemplazar a los análisis químicos en el laboratorio, más costosos y menos respetuosos con el medio ambiente. La combinación de herramientas quimiométricas con las técnicas de CG-IMS y NIRS ha permitido clasificar la grasa en función del periodo de alimentación en montanera y de la raza. Todo ello apunta al enorme potencial la metodología NIRS para garantizar la autenticidad de las canales en el sector del cerdo ibérico, ofreciendo la posibilidad de conocer los resultados de forma inmediata y de operar de forma rutinaria en las líneas de faenado.

SUMMARY

The Iberian pig is an indigenous breed associated with the *dehesa* ecosystem, which is located in the southwest of the Iberian Peninsula. It is well known for the remarkable organoleptic quality of its derivatives. The high demand for Iberian products, together with the limited production of Iberian pigs reared extensively and fed on acorns and grass (the *montanera* system), has led to intensive rearing of this breed and also to its crossbreeding with improved breeds. The final quality of the meat from these animals and their products is strongly correlated with different factors such as animal production, the breed, the feeding regime, and the age or slaughter weight. Several analytical techniques have been studied and applied to guarantee the authenticity of the breed and the feeding regime. However, there is currently no official analytical method for the purpose.

Near Infrared Spectroscopy (NIR) is a multi-parametric tool which has been widely used to assess meat characteristics and meat product quality. In the sector of the Iberian breed, NIR technology has been applied to quantify protein, fat, and moisture, to predict the fatty acid profile, and to determine the feeding regime during the fattening period. This analytical methodology allows immediate individualised results to be obtained without sample destruction and in an environmentally friendly manner. However, the spectra obtained need to be interpreted by complex chemometric methods.

This PhD thesis proposes the use of NIRS technology for predicting parameters which determine the quality of Iberian pig fat, such as the lipid profile and the carbon isotopic ratio $\delta^{13}\text{C}$ (‰). The application of NIRS technology and gas chromatography together with ion mobility spectrometry (GC-IMS) for classification/authentication purposes is also addressed. Finally, this study analyses the viability of using portable equipment, which facilitates work *in situ* and has experienced a boom in recent years.

The first article included in the PhD thesis evaluated the feasibility of predicting the lipid profile composition and the $\delta^{13}\text{C}$ (‰) of intact subcutaneous fat by using a portable NIRS device. The results were compared with those obtained by using benchtop NIRS equipment on both extracted and intact fat.

In the second article, the changes in the lipid profile and the carbon isotope ratio observed before and after the fattening period on the *montanera* were evaluated. The influence of different *montanera* times on these parameters was also analysed. Significant correlations between the $\delta^{13}\text{C}$ isotope (‰) and the different fatty acids were studied in order to classify the samples according to animal feeding.

The third article compares the classification ability of NIRS and GC-IMS technologies when applied at slaughter to subcutaneous fat. The aim was to achieve a correct classification according to the breed and the number of days spent feeding under the *montanera* system.

The conclusions deriving from the present studies indicate that the application of NIR spectroscopy, using both benchtop and portable equipment, is suitable for predicting the quality parameters of Iberian fat. This technology could replace costlier and less environmentally-

friendly laboratory chemical analyses. The combination of chemometric tools with NIRS and GC-IMS technologies has made it possible to classify Iberian fat correctly according to the fattening time and the breed. All these results point to the enormous potential of NIRS technology to guarantee the authenticity of Iberian pig carcasses. In fact, it offers the possibility of ascertaining the results immediately which allows for routine operations on the slaughter lines.

II. HIPÓTESIS DE PARTIDA Y OBJETIVOS /
STARTING HYPOTHESIS AND OBJECTIVES

HIPÓTESIS DE PARTIDA Y OBJETIVOS

Hipótesis

El sector del cerdo ibérico está destinado principalmente a la elaboración de productos curados de alto valor añadido. Los productos de mayor calidad están ligados al sistema tradicional de cebo en montanera de los cerdos ibéricos. En este sistema se combinan dos factores determinantes para la calidad como son la alimentación (a base de bellota y pastos) y la raza.

La competitividad de la industria, la demanda de productos curados derivados del cerdo ibérico y la existencia de procesos fraudulentos en la alimentación animal han impulsado el desarrollo de sistemas que permitan garantizar la autenticidad a través de la determinación de parámetros de calidad.

Son diversas las técnicas analíticas aplicadas en el sector a lo largo de la historia con fines de caracterización y predicción de la calidad de la materia prima. Entre ellos están el análisis del perfil lipídico mediante cromatografía de gases, la cuantificación de la relación de isótopos estables de carbono en el tejido adiposo, la determinación de la composición de volátiles etc.

El crecimiento y mejora de la rentabilidad del sector ha dado lugar a la innovación en las metodologías de análisis con el fin de implementar métodos objetivos y rápidos para la caracterización de las materias primas en las ganaderías y/o industrias. La espectroscopia NIR cumple con los requerimientos planteados en el sector. Así, es una técnica no invasiva, que no requiere personal cualificado para su uso, es inmediata y multiparamétrica. Además, el desarrollo de nuevos dispositivos NIRS portátiles, así como el empleo de equipos que disponen de fibra óptica está permitiendo su incorporación como método de análisis rutinario a lo largo de la cadena de producción.

Otra técnica analítica que permite la autenticación de la materia prima o de piezas de productos curados es la espectrometría de movilidad iónica (GC-IMS). Esta técnica analítica se fundamenta en la determinación del perfil de compuestos volátiles de la grasa subcutánea de canales o piezas nobles. Su aplicabilidad es más reciente en el sector y está demostrando un alto potencial para clasificar en función de la raza y del régimen de alimentación.

El principal inconveniente que tienen estas tecnologías es el tratamiento de las grandes matrices de datos que se generan. Para ello, se precisa de herramientas de análisis multivariantes que permitan desarrollar un modelo con fines predictivos o de clasificación, así como personal cualificado que los desarrolle.

Sin embargo, y a pesar de su potencial, las metodologías citadas están muy lejos de poder ser contempladas en normativas que las avalen como técnicas oficiales de análisis. Por ello, el sector requiere de investigaciones que demuestren la validez de los modelos para ciertos parámetros que permitan poder asegurar la autenticidad de los productos a los consumidores.

A partir de estos antecedentes, la **hipótesis de partida** es el posible desarrollo de una metodología que permita determinar parámetros de la calidad y autenticidad de las canales de cerdo ibérico en función de la influencia de dos factores principales como son la genética y la duración de la etapa de cebo en montanera.

Objetivos

Para dar respuesta a la hipótesis se ha planteado los siguientes objetivos:

- **Objetivo 1:** Estudiar la influencia y correlación de la genética y los días en montanera en la fase de cebo sobre parámetros determinantes de la calidad del cerdo ibérico.
- **Objetivo 2:** Aplicar la tecnología NIRS para la predicción de parámetros determinantes de la calidad del cerdo ibérico (ácidos grasos y relación de isótopos de carbono).
- **Objetivo 3:** Evaluar el potencial predictivo de equipos NIRS portátil frente a equipos de sobremesa en parámetros determinantes de la calidad de las canales de cerdo ibérico.
- **Objetivo 4:** Evaluar la viabilidad de la tecnología NIRS y la cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de movilidad iónica con el fin de clasificar según el tiempo en montanera y la raza animal.
- **Objetivo 5:** Establecer el tipo de muestreo más adecuado en la técnica GC-IMS de cara a su implementación.

STARTING HYPOTHESIS AND OBJECTIVES

Hypothesis

The Iberian pork sector is mainly dedicated to the production of cured products with high added value. The highest quality products are associated with the traditional system of fattening the Iberian pig on the *montanera*. This system combines two crucial factors for achieving quality, namely the acorn and grass feeding programme and the Iberian breed.

The strong competitiveness of the industry, the demand for cured Iberian pork products, and the existence of fraudulent processes in animal feeding have led to the development of systems to guarantee the authenticity of products by determining quality parameters.

The analytical techniques which have been used in the Iberian sector throughout history are diverse and aim to characterise and predict the quality of the raw material. These include the analysis of the lipid profile by gas chromatography, the quantification of the ratio of stable carbon isotopes in the fatty tissue, and the determining of volatile compounds, among others.

The increasing and improving profitability of the sector has led to innovation in analytical methodologies in order to implement objective and rapid methods for the characterisation of raw materials for livestock farms and/or industries. NIR spectroscopy meets the requirements of the sector. This means that NIRS is a non-invasive, immediate, and multi-parametric technique which does not require qualified personnel. In fact, the development of new portable NIRS devices and the use of equipment together with a fibre optic probe allows its implementation for routine operations on production lines.

Another analytical technique which allows the authentication of raw materials or cured products is ion mobility spectroscopy (GC-IMS). This technique is based on the determining of the profile of volatile compounds in the subcutaneous fat of carcasses or high quality products. Its applicability is more recent in the Iberian sector and it is showing great potential for classification purposes according to the breed and the feeding system.

The major problem with these technologies is the processing of the large data matrices generated. This requires multivariate analysis tools which allow the development of models for predictive or classificatory purposes and also qualified personnel for their development.

However, despite their potential these methodologies are far from being taken into account by the regulations, which endorse them as official technical analyses. Therefore, the Iberian sector requires further research to demonstrate the validity of the models developed for certain parameters so as to make it possible to ensure the authenticity of the products for consumers.

Based on this background, the **initial hypothesis** is the possible development of a methodology to determine the quality parameters and authenticity of Iberian pig carcasses according to the influence of two main factors: genetics and the fattening time on the *montanera*.

Objectives

In order to respond to the initial hypothesis, the following objectives have been proposed:

- **Objective 1:** Studying the influence and correlation of the genetics and the number of days spent on the *montanera* during the fattening period on the parameters determining the quality of Iberian pork.
- **Objective 2:** Using NIRS technology to predict parameters determining the quality of Iberian pork: fatty acids and the stable carbon isotope ratio.
- **Objective 3:** Evaluating the predictive potential of portable NIRS devices in comparison with benchtop devices on the major quality parameters of Iberian pig carcasses.
- **Objective 4:** Assessing the feasibility of using NIRS and gas chromatography coupled to ion mass spectrometry to obtain classifications according to the fattening time on the *montanera* and the breed.
- **Objective 5:** Establishing the most suitable sampling methodology for the GC-IMS technique in order to apply it.

III. INTRODUCCIÓN

1. EL CERDO IBÉRICO

1.1. La raza porcina ibérica

El cerdo ibérico es una especie porcina autóctona-local de la Península Ibérica y por lo tanto solo se encuentra en España y Portugal. El origen de esta raza no se conoce con certeza, pero hay cierta unanimidad en que el origen del cerdo ibérico proviene de una agrupación racial que deriva del jabalí (*Sus mediterraneus*) que poblaba el norte de África y pasó a ocupar posteriormente zonas del suroeste de la Península Ibérica. Diversos estudios han evidenciado, mediante la aplicación de marcadores moleculares, que la raza ibérica presenta ausencia de introgresión procedente de razas asiáticas y de otras razas comerciales (Alves et al., 2003; Ollivier, 2009; SanCristobal et al., 2006).

El tronco ibérico se ha considerado como una agrupación racial autóctona donde se pueden encontrar una gran diversidad de variedades, estirpes o líneas con la piel negra-rojiza (Muriel, Ruiz, et al., 2004). La definición de estas estirpes y líneas se ha basado tradicionalmente en parámetros morfológicos (coloración de la capa y ausencia o presencia de pelo) y la consanguinidad a partir del pedigrí (Clemente et al., 2008; Fernández et al., 2002). En 2007 en el Registro Oficial de Razas Ganaderas se reconocieron las siguientes estirpes de cerdo ibérico: Retinto, Lampiño, Entrepelado y Torbiscal (Orden APA/3376/2007).

Estirpe Retinta: el nombre se le asigna por la capa retinta uniforme pudiendo existir algún individuo con variación en la tonalidad. Presenta pelo regularmente distribuido. Se caracteriza por tener un esqueleto fino y ligero, cabeza de frente ancha y orejas en alero de tejado. La columna tiende a la rectitud con lomos, tercio posterior y jamones bien desarrollados (Figura 1).



Figura 1: Estirpe Retinta
(Fuente: www.mapa.gob.es)

Estirpe Lampiño: tiene tendencia a un mayor engrasamiento con menor precocidad y desarrollo corporal. No tiene cobertura de pelo o estos son finos y escasos pudiéndose observar pliegues cutáneos característicos en la región frontal. La coloración de la piel es variable entre el negro intenso y el colorado, siendo lo más típico el color retinto. La cabeza está bien proporcionada, frente pequeña, orejas amplias y caídas, hocico marcadamente alargado y en ocasiones presenta una mancha blanca característica en el rodete de la jeta. Las extremidades pueden ser finas o gruesas con extremidades cortas y lomos con prominencia en el morrillo (Figura 2).



Figura 2: Estirpe Lampiño
(Fuente: www.mapa.gob.es)

Estirpe Entrepelado: tiene origen en el cruzamiento entre Lampiño y Retinto, con mayor precocidad y menos engrasamiento que el Lampiño, pero sin llegar a los niveles del Retinto. Su conformación y extremidades son finas con color de piel retinto oscuro o negro al nacimiento y escaso pelo. Cuando son adultos la coloración es negra (Figura 3).



Figura 3: Estirpe Entrepelado
(Fuente: www.mapa.gob.es)

Estirpe Torbiscal: animales de mayor alzada, con mayor prolificidad y muy rústicos. El color de la capa es color pizarra, aunque puede presentar variables tonalidades con hocico y vientre rosáceos. Posee una cabeza característica en la que destaca la longitud de las orejas y el hocico largo. El dorso es de mayor longitud y rectitud. Las extremidades se caracterizan por tener la pezuña jaspeada o incluso despigmentada y no presenta caña fina (Figura 4).



Figura 4: Estirpe Torbiscal
(Fuente: www.mapa.gob.es)

A pesar de las diferentes características morfológicas se puede decir que todas las estirpes cuentan con una serie de características positivas y claves para llegar a producir productos curados con propiedades sensoriales de máxima calidad. Cabe citar la tendencia a acumular grasa (capacidad adipogénica) e infiltración de la grasa en los músculos. Su gran rusticidad le permite resistir las duras condiciones ambientales. Gracias a su capacidad de adaptación al medio puede soportar los periodos en los cuales la alimentación es escasa siendo capaces de aprovechar al máximo los recursos de la dehesa. Entre los aspectos negativos de esta raza encontramos una mala conformación cárnica, baja precocidad, crecimiento lento y baja prolificidad. Para la mejora de estos aspectos se recurrió a la mejora genética mediante cruzamientos de la raza ibérica a través de la vía paterna con otras razas porcinas (M. P. Serrano et al., 2008). Sin embargo, los cruces terminan afectando a la calidad de los productos tanto frescos como curados (Ramírez y Cava, 2007). La raza mejorante por excelencia ha sido la raza Duroc debido a que se obtienen mayor prolificidad, mayores pesos al sacrificio, crecimiento más rápido y una mejor conformación cárnica sin verse menoscabadas las características de rusticidad y adaptación al medio. De hecho, es la única raza reconocida por la norma de calidad actual para llevar a cabo cruzamientos (Real Decreto; RD 4/2014).

La cabaña ganadera ibérica se concentra fundamentalmente en el suroeste de la Península Ibérica, donde desde hace siglos se integró perfectamente la producción ganadera porcina con el ecosistema de la dehesa (de Miguel et al., 2015). La dehesa puede definirse como un sistema mediterráneo silvopastoril que liga la producción y la conservación de la naturaleza (Olea y San Miguel-Ayanz, 2006). El agroecosistema tiene su origen en la intervención del hombre mediante podas, eliminación del matorral y aclarado del arbolado del original bosque poblado por arbustos y árboles del género *Quercus* (encinas, alcornoques y robles). La principal fuente de alimentación que aporta son las bellotas y los pastos existentes en la cubierta vegetal. El clima característico de esta zona peninsular se basa en veranos cálidos e inviernos no muy fríos con baja pluviosidad (concentrada en otoño y primavera) y con gran variabilidad entre años. El ciclo vegetativo de la dehesa empieza en el mes de octubre con las primeras lluvias y a partir de este momento el terreno se cubre de pasto conocido como otoñada y comienzan a madurar los frutos de encinas y alcornoques. Esta época del año coincide con el sistema tradicional de acabado del cerdo ibérico que se caracteriza por mantener a los animales en libertad durante un periodo de tiempo de 2-3 meses previo al sacrificio en el cual aprovechan los recursos naturales de la dehesa. Esta etapa es conocida en el sector del porcino ibérico como montanera. España cuenta con 3,5 millones de hectáreas de dehesa, considerado el mayor sistema agroforestal de Europa (Den Herder et al., 2017) distribuidas principalmente en el sur de Castilla y León, Extremadura y Andalucía.

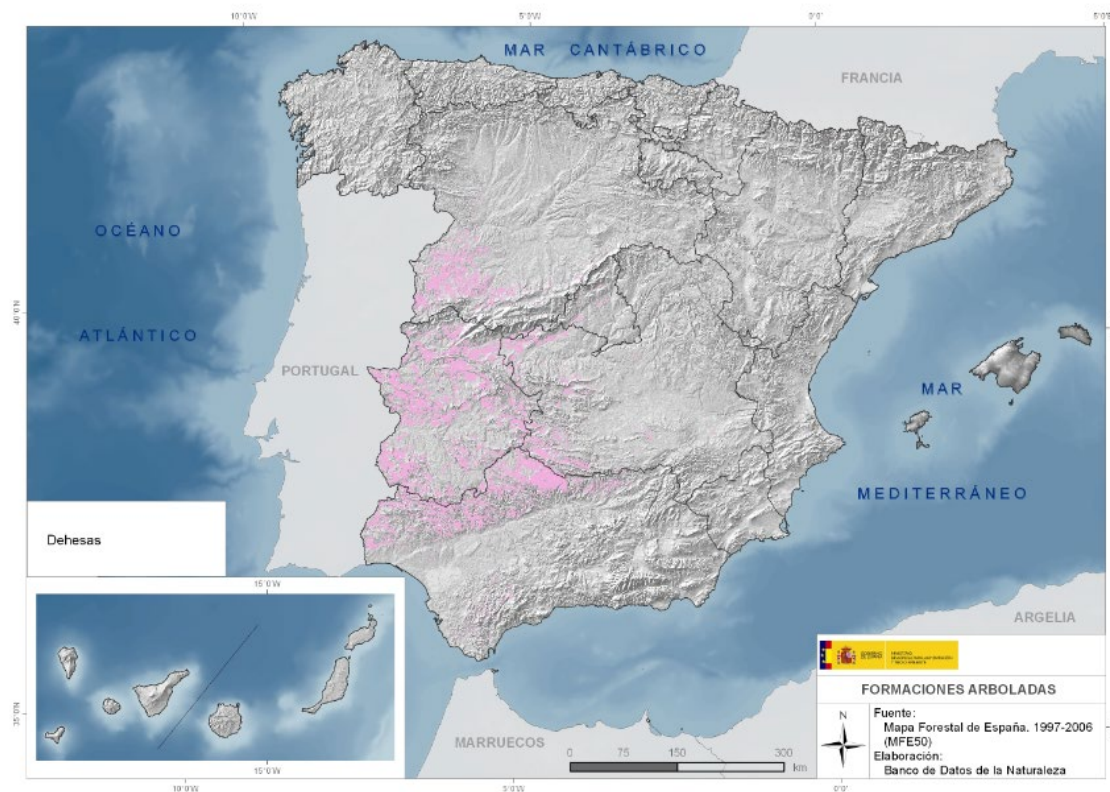


Figura 5: Mapa de las áreas de dehesa en España. (Fuente: Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico).

Cuando el manejo ganadero es el adecuado respetando el número de cabezas de ganado por hectárea de dehesa (teniendo en cuenta la producción de bellota de la temporada), estamos ante un sistema productivo en la fase de cebo totalmente sostenible. La mayoría de las canales producidas se destinan a la elaboración de productos curados de alta calidad (jamones, paletas y lomos) muy valorados tanto en el mercado nacional como internacional. El engorde en libertad en la dehesa tiene importantes consecuencias en la calidad de la carne.

La alta demanda de los productos junto con una producción limitada de cerdos de bellota en regímenes extensivos ha dado lugar a regímenes intensivos y al uso del genotipo cruzado (Mesías et al., 2009; S. Ventanas, Ventanas, et al., 2007). Por ello, actualmente encontramos diferentes calidades y precios en los productos consecuencia de las modificaciones a las que se ha ido sometiendo al sistema de crianza tradicional (Tejerina et al., 2012).

Debido a la importancia de las producciones de alta calidad ligadas a la dehesa en los últimos años se han llevado a cabo diversas investigaciones, las cuales persiguen estudiar cuáles son los factores asociados directamente con los atributos de calidad a lo largo de todo el proceso tanto para la carne fresca como de los productos curados. Algunos de los autores han centrado sus investigaciones en el estudio de los factores asociados al ciclo productivo (Benítez et al., 2019; Fuentes et al., 2014; Sanz-Fernández et al., 2022; Tejerina et al., 2012; S. Ventanas et al., 2008) y otros en el proceso tecnológico de curación (Andrés et al., 2004; Pérez-Palacios et al., 2011; Ruiz, Ventanas, et al., 1998).

1.2. El sector porcino en España

Según la última estadística publicada referente al año 2021 por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA) (EUROSTAT y SG Análisis, Coordinación y Estadística, MAPA, 2021) el sector porcino en España aporta el 15,9% de la Producción Final Agraria y un 42,5% del total de la producción ganadera siendo un pilar importante en la economía del país. En los últimos años se ha observado un crecimiento notable tanto en la producción como en los censos y número de explotaciones. A nivel mundial, España se ha posicionado en el tercer lugar como productor de carne porcina después de China y Estados Unidos. A nivel de la Unión Europea (UE) se posiciona en primer lugar con un 22,1% de la producción y mayor censo seguido por Alemania con un 21,2% de la producción. Este crecimiento ha estado motivado por los mercados exteriores y la competitividad del sector a nivel mundial observándose un incremento de las exportaciones de carne porcina española con un incremento del 3,7% con respecto al año 2020.

Dentro del sector porcino español distinguimos dos líneas de producción muy diferentes. Con un 89,6% del censo porcino se encuentra la producción que emplea razas blancas y un 10,4 % del censo porcino está destinado al cerdo ibérico (EUROSTAT y SG Análisis, Coordinación y Estadística, MAPA, 2021). Hay que destacar la importancia que tiene este subsector minoritario en la economía española al dar lugar a productos cárnicos selectos y de alto prestigio en el mercado nacional e internacional siendo el jamón ibérico el más demandado (Buxadé y Daza, 2000; Mesías et al., 2009; J. Ventanas, 2001).

Con la entrada de la actual norma de calidad en el año 2014 (RD 4/2014) se establece de obligado cumplimiento la inscripción de los reproductores en el libro genealógico siendo este censo indicativo de las oscilaciones de individuos de la raza. Según los datos recogidos en el censo del MAPA el número de animales registrados en el libro genealógico a finales del año 2018 fue de 741.685 animales totales de los cuales 541.558 fueron hembras reproductoras. El censo aumentó en el año 2019 y 2020 hasta un total de 604.583 hembras reproductoras. Tradicionalmente el sector ibérico se ha encontrado muy atomizado, asociado a producciones tradicionales y familiares, pero esta tendencia está cambiando debido a que el número de ganaderías está experimentando un descenso paulatino, lo cual es indicativo de que cada vez existen ganaderías con mayor número de cabezas de ganado.

Además de la montanera basada en los recursos de la dehesa existen otros sistemas productivos más intensificados en los que se introducen nuevas fuentes de alimentación a base de cereales. Estos sistemas productivos utilizan instalaciones más o menos intensificadas y cruces de la raza ibérica con razas más magras que fomenta el crecimiento diario respecto a los animales genéticamente puros (Buxadé y Daza, 2000). En la última década la producción mayoritaria es de piezas nobles procedentes de sistemas intensivos con manejos similares al cerdo blanco, pero con algunas salvedades que se ajustan a las características de crecimiento de la raza ibérica como son edades de sacrificio y pesos (Figura 6).

Como se comentará en el apartado 1.3.1 referente a la actual Norma del cerdo ibérico, las piezas llevan una identificación distintiva en precinto diferenciando cuatro categorías. Si se observa la figura 6 se puede ver la evolución de las categorías de productos (jamones y paletas) en relación a los sistemas productivos desde la implantación de la Norma en el año 2014 hasta el año 2021.

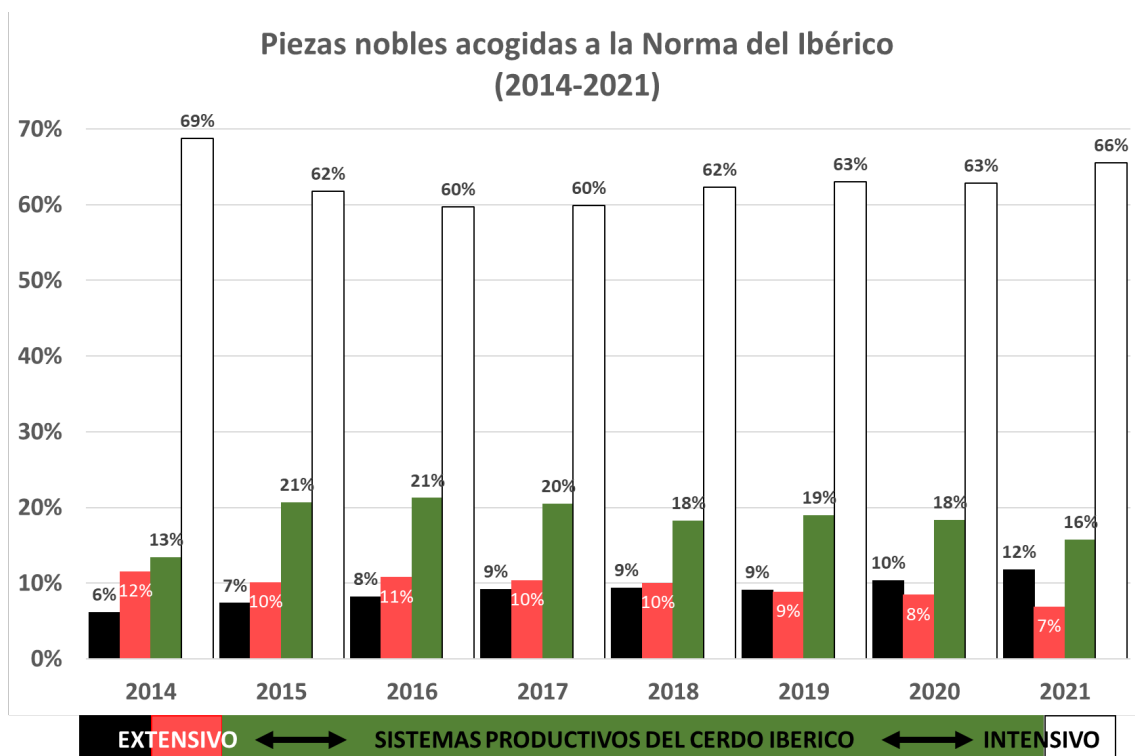


Figura 6: Porcentaje del número de precintos colocados en cada año a piezas de jamón y paleta con la identificación de la Norma de cerdo ibérico (RD 4/2014). Precinto de color negro identifica a la categoría Bellota 100% Ibérico, color rojo Bellota Ibérico, color verde Ibérico de Cebo de Campo y el blanco Ibérico de Cebo. (Fuente: Asociación Interprofesional del Cerdo Ibérico (ASICI, 2022).

El régimen de montanera otorga a las piezas calidades diferenciadas y ha estado tradicionalmente asociada a cerdos de raza 100% ibérica. Esta tendencia se mantiene y se ve reflejada en los datos de animales certificados bajo la actual norma del cerdo ibérico, así como en las denominaciones de origen que promueven cebos en regímenes de montanera o extensivos y con purezas raciales del 100% o mínimo un 75% ibérica. Si observamos los datos de los animales sacrificados en la montanera 2021-2022 que se han alimentado en montanera bajo la certificación de la actual Norma del cerdo ibérico (RD 4/2014) se observa que el 64% de los animales son 100% ibéricos frente al 36% de animales de raza Ibérica x Duroc (8% de los animales fueron de raza 75% ibérica y el 28% de raza 50% ibérica) (ASICI 2022).

Actualmente las prioridades de los consumidores están cambiando debido a que dan mayor importancia a los aspectos productivos de los alimentos que consumen. A la hora de escoger los productos cárnicos tienen en cuenta la calidad y el precio, aunque también consideran el bienestar animal, la seguridad alimentaria y el impacto causado por el sistema de producción en el medio ambiente (Dransfield et al., 2005).

También se ha experimentado en los últimos años un aumento en el consumo de carne fresca de cerdo ibérico criado en libertad considerándola una alternativa de alta calidad a la carne de cerdo magro consumida habitualmente en España (Mayoral et al., 2005; Ramírez y Cava, 2007).

1.3. Figuras de calidad en productos ibéricos

Actualmente existen diferentes figuras que otorgan una calidad diferenciada a los productos derivados del cerdo ibérico. Entre ellas se encuentran las diferentes Denominaciones de Origen Protegidas (DOPs) del jamón ibérico (“Guijuelo”, “Dehesa de Extremadura”, “Jamón de Jabugo” y “Los Pedroches”) y la norma de calidad del cerdo ibérico. El origen de estas figuras se encuentra en el esfuerzo dedicado por parte de las industrias del sector y asociaciones de ganaderos e industriales apoyados por la Administración pública. Su objetivo era potenciar y revalorizar el sector del porcino Ibérico debido a que en los años 60 y 70 los cruzamientos con razas mejorantes hicieron peligrar la diversidad genética intrínseca del tronco Ibérico. A lo largo del tiempo, han ido surgiendo nuevas asociaciones que potencian la revalorización de la raza, los productos, y sistemas de producción entre otros. A continuación, se menciona alguna de ellas como es la Asociación Española de Criadores de Ganado Porcino Selecto Ibérico Puro y Tronco Ibérico (AECERIBER), la Asociación Interprofesional del Cerdo Ibérico (ASICI), el Consorcio Para la Promoción del Jamón Ibérico Español (Real Ibérico) y la Asociación de Productores de Cerdo Ibérico de Extremadura (ibericoextremadura) entre otras.

Las figuras de calidad han llevado a cabo la implementación de controles de calidad orientados principalmente a la raza y a la determinación del régimen alimenticio de los animales durante el periodo de montanera. Los programas contemplan diversos controles como la supervisión de los recursos disponibles en la dieta, el establecimiento de cargas ganaderas en campo y los controles de peso de los animales en la entrada y salida de la montanera.

En el año 2014 entró en vigor la actual norma de calidad del sector ibérico (RD 4/2014) con el fin de facilitar al consumidor la identificación de los productos disponibles en el mercado. Se diferencian en ella cuatro estándares de calidad reforzando el sistema de trazabilidad mediante la obligación de precintar las piezas en el matadero. Los precintos son asignados por la ASICI. El objetivo es garantizar la homogeneidad y autenticidad de los productos finales, estableciendo una serie de requisitos mínimos productivos e industriales de obligado cumplimiento, para cada una de las categorías comerciales.

Para hacernos una idea de lo que supone la certificación de DOP frente a la Norma del ibérico, el número de animales sacrificados bajo las 4 DOPs supone casi tres veces menos el número de animales sacrificados bajo el precinto negro de la norma de calidad (435.955 animales) (ASICI 2022). En cuanto a las producciones de las DOP, en la montanera 2021-2022 se han sacrificado 116.437 animales correspondiendo el 34% a Guijuelo, el 25% a Dehesa de Extremadura, el 23% a Jabugo y el 18 % a Los Pedroches.

- **Actual Norma del cerdo ibérico**

A continuación, se lleva a cabo un resumen de la actual Norma del cerdo ibérico (RD 4/2014, de 10 de enero, por el que se aprueba la norma de calidad para la carne, el jamón, la paleta y la caña de lomo ibérico). Desde la entrada en vigor del citado RD ha sufrido una modificación de la disposición transitoria 2, por RD 818/2015, de 11 de septiembre (RD 818/2015). Además, se ha añadido una disposición adicional 4 por el RD 255/2016, de 10 de junio (RD 255/2016).

Las medidas que establece se pueden agrupar en tres apartados:

- La especificación de la pureza racial en el etiquetado (100% ibérico o especificar si es 75-50% ibérico).
- Tres tipos de alimentación (bellota, cebo de campo y cebo).
- Nuevo etiquetado dando lugar a los precintos de colores que se encuentran en el mercado (negro, rojo, verde y blanco).

Los controles oficiales durante el proceso de explotación ganadera hasta el consumidor de los productos acogidos a la Norma del ibérico se llevan a cabo por las comunidades autónomas. Además, se exige a los operadores verificar su sistema de autocontrol mediante el contrato de una entidad de inspección o certificación.

I. Denominación de venta y etiquetado

La denominación de venta de los productos regulados por la actual Norma del ibérico incluye la designación por producto, por alimentación y manejo y por tipo racial.

- a. Por producto: debe de identificarse como jamón, paleta y lomo en el caso de los productos elaborados. Para los productos obtenidos del despiece de la canal en fresco debe de nombrarse la pieza de la que procede de acuerdo con las denominaciones de mercado junto con las preparaciones y presentaciones comerciales.
- b. Por alimentación y manejo: existen tres categorías diferentes como son de bellota, de cebo de campo y de cebo.

<<De bellota>>: productos de animales sacrificados después del aprovechamiento exclusivo de bellota, hierba y otros recursos naturales de la dehesa, sin aporte suplementario de pienso.

Las principales características de esta categoría se centran en:

- Las parcelas y recintos donde pastarán los animales cuyos productos vayan a comercializarse bajo el etiquetado <<de bellota>>deben de estar identificados en el Sistema de Información Geográfica de Parcelas Agrícolas (SIGPAC) en la capa Montanera según lo establecido en el RD 2128/2004.
- El aprovechamiento de los recursos de la dehesa debe de realizarse teniendo en cuenta la superficie arbolada y la carga ganadera máxima admisible según la disponibilidad de bellota de cada campaña. La valoración se lleva a cabo por las entidades de inspección previa a la entrada de los animales en montanera.
- El periodo de montanera deberá iniciarse entre el 1 de octubre y el 15 de diciembre y se establece un periodo de sacrificio entre el 15 de diciembre y 31 de marzo.
- Los animales deben cumplir las siguientes condiciones mínimas en cuanto a peso y edad:
 - El peso medio del lote a la entrada de montanera deberá estar comprendido entre 92 y 115 Kg.

- La reposición mínima en montanera será de 46 Kg durante al menos 60 días.
- La edad mínima de sacrificio será de 14 meses.
- El peso mínimo individual de la canal será de 115 Kg para animales 50-75% ibéricos y de 108 kg para los animales 100% ibéricos.

<<De cebo de campo>>: productos de animales sacrificados tras haber permanecido aprovechando los recursos de la dehesa o el campo y durante algún momento del periodo de cebo se ha suplementado la alimentación con piensos constituidos por cereales y leguminosas. El manejo se realiza en explotaciones extensivas o intensivas al aire libre pudiendo tener parte de la superficie cubierta.

Las principales características de esta categoría se centran en:

- Los animales se cebarán en explotaciones de cebo extensivas cumpliendo con los requisitos establecido en el RD 1221/ 2009, de 17 de julio, por el que se establecen normas básicas de las explotaciones de ganado porcino extensivo.
- Cumpliendo con los requisitos establecidos en el RD 324/2000, de 3 de marzo los animales podrán cebarse en explotaciones de cebo intensivas al aire libre pudiendo tener parte de la superficie cubierta.
- La estancia en la explotación debe ser mínimo de 60 días previos al sacrificio.
- La edad mínima para sacrificio será de 12 meses.
- El peso mínimo individual de la canal se establece en 115 kg para los animales cruzados y 108 kg para los 100% ibéricos.

<<De cebo>>: productos de animales alimentados con piensos y el manejo realizado en sistemas de explotación intensiva.

Las principales características de esta categoría se centran en:

- Según las condiciones de cría establecidas en el RD 1135/2002, de 31 de octubre, relativo a las normas mínimas para la protección de cerdos, los animales con un peso vivo mayor de 110 kg que den lugar a productos bajo la designación <<de cebo>> deben disponer de una superficie mínima de suelo libre total por animal de 2 m² en la fase de cebo.
- La edad mínima al sacrificio será de 10 meses y el peso mínimo individual de 108 kg para los animales de raza 100% ibéricos y de 115 kg para los animales cruzados.

c. Por raza:

<< 100% ibérico>>: productos procedentes de animales con un 100% de pureza genética de la raza ibérica, cuyos progenitores tengan así mismo un 100% de pureza racial ibérica y estén inscritos en el correspondiente libro genealógico.

<<Ibérico>>: productos procedentes de animales con al menos el 50% de su porcentaje genético correspondiente a la raza porcina ibérica siempre que los progenitores cumplan las siguientes características:

- Para la obtención de animales del 75% ibérico se emplearán hembras de raza 100% ibérica inscritas en libro genealógico y machos procedentes del cruce de madre de raza 100% ibérico y padre de raza 100% Duroc, ambos inscritos en el Libro genealógico de la raza.
- Para la obtención de animales 50% ibéricos se emplearán hembras de raza 100% ibéricas y machos de raza 100% Duroc, ambos inscritos en el libro Genealógico de la raza.
- La justificación del factor racial de los progenitores se realizará mediante <<certificado racial>>, emitido por la correspondiente asociación oficialmente reconocida para la gestión del Libro genealógico.

II. Identificación y trazabilidad de los productos

La identificación de las canales y marcado de piezas tienen lugar tras el sacrificio una vez que se realiza el pesaje individual de las canales mediante báscula o sistema de medida fiable y no manipulable. Aquellas canales que no cumplan con el peso mínimo establecido según el tipo racial de los animales serán descalificadas. El matadero es el responsable de verificar el cumplimiento y dejará constancia en su registro de trazabilidad y emitirá informe de cada lote con el número de canales aptas y descalificadas.

En el mismo matadero una vez aptas las canales se procede, en cada lote de productos, a identificar jamones y paletas mediante un precinto inviolable que será de distinto color para cada una de las denominaciones de venta (Figura 7):

- Negro: de bellota 100% ibérico
- Rojo: de bellota ibérico
- Verde: de cebo de campo ibérico
- Blanco: de cebo ibérico



Figura 7: Precintos según las denominaciones de venta de productos acogidos a la actual Norma del cerdo ibérico (RD 4/2014, de 10 de enero). Precinto de color negro identifica a la categoría Bellota 100% Ibérico, color rojo Bellota Ibérico, color verde Ibérico de Cebo de Campo y el blanco Ibérico de Cebo.

El precinto incluye de forma indeleble y legible una numeración individual y única de la pieza que se va a correlacionar en los registros de trazabilidad con la canal que proceda dentro del lote de sacrificio. Los precintos se mantendrán en todo momento, incluido en el punto de venta y establecimientos de restauración, y no podrá colocarse ningún otro precinto.

En el caso de los productos obtenidos del despiece de la canal que se comercializan en fresco, la identificación deberá estar contemplada en una etiqueta adherida al envase del producto que contendrá la denominación de venta del producto.

En todas las etapas de la producción, transformación, almacenamiento y distribución deberá asegurarse la trazabilidad de los productos objeto de la norma.

III. Elaboración de los productos

En cuanto a las técnicas empleadas en el proceso la norma contempla que se llevarán a cabo con el objetivo de obtener productos de máxima calidad y que reúnan todas las características tradicionales del jamón ibérico, la paleta ibérica y la caña de lomo ibérico.

El proceso de elaboración de jamones y paletas ibéricas se llevará a cabo con las piezas íntegras y constará de las siguientes fases: salazón lavado, post-salado y curado-maduración. En el caso del proceso de elaboración de la caña de lomo ibérico se llevarán a cabo las fases de adobado y embutido en tripas naturales o artificiales y posterior curado-maduración.

La norma establece unos pesos y tiempos mínimos para la elaboración de los productos. Para poder verificar los tiempos mínimos de elaboración de jamones y paletas a lo largo de la vida del producto, se colocará en sitio visible una identificación inviolable y legible que incluya dos dígitos de la semana de entrada en salazón y los dos dígitos finales del año.

El control de pesos y tiempos mínimos se registran a la entrada en salazón y serán los siguientes:

En el caso de la paleta el tiempo mínimo de elaboración es de 365 días (independientemente del peso). Para el jamón es de 600 días si el peso de la pieza es menos de 7 kg en fresco y de 730 días si la pieza es igual o mayor a 7 kg. En el caso del lomo el tiempo mínimo de elaboración es de 70 días.

En el momento de la salida de la instalación de la industria final se exige un peso mínimo mayor o igual a 3,7 kg en el caso de la paleta 100% ibérica y mayor o igual a 4 kg en la paleta ibérica. En el caso del jamón 100 % ibérico se exige un peso en la pieza final mayor o igual a 5,75kg cuando la raza es 100% ibérica y mayor o igual a 7kg en el caso de la raza 100% ibérica.

2. EL CERDO IBÉRICO COMO MATERIA PRIMA

Los productos curados se van a procesar a partir de la pieza entera, por esta razón su composición resultará fundamental en las características finales del producto. La materia prima representa más del 70% de la calidad del producto final (J. Ventanas, 2012).

2.1. Ciclo productivo

El ciclo productivo tradicional del cerdo ibérico podemos decir que está integrado por tres fases claramente diferenciadas:

- Periodo de cría: los animales permanecen en esta fase desde que nacen hasta el momento del destete alcanzando un peso aproximadamente de 23 kg. En esta fase se les considera y denomina “lechones”.
- Periodo de recría: se inicia después del destete. En esta fase diferenciamos dos etapas. En una primera etapa con pesos de 23 a 58 kg se les conoce como “marranos” y una segunda etapa con pesos comprendidos entre 58 kg a 104 kg se les asigna el nombre de “primales”. En este periodo se persigue que el animal desarrolle tejido óseo y muscular procurando no acumular mucha grasa. Para ello se lleva a cabo un racionamiento de la alimentación aportándole piensos poco energéticos y ricos en fibra.
- Periodo de cebo: es la etapa previa al sacrificio del animal en la que llega a alcanzar pesos de 160-185 kg peso vivo. Es la fase que más va a influir en la calidad de los productos (Andrés et al., 2001; Wood et al., 2004). Podemos clasificar los sistemas de cebo en dos grandes grupos con posibilidad de combinar ambos dando lugar a diferentes categorías de productos del cerdo ibérico (Tejerina et al., 2012). Por un lado, está el tradicional sistema de cebo, la montanera. En esta etapa el animal puede llegar a consumir una cantidad de bellota de entre 7-10 kg y 3-4 kg de hierba (Espárrago Carande, 1998). La abundancia de alimento en la dehesa proporciona dietas hiperenergéticas lo cual hace que el animal destine este exceso de energía a la síntesis de grasa. El cerdo terminado en montanera da origen a productos curados con mejores atributos sensoriales (Díaz-Caro et al., 2019; S. Ventanas et al., 2005). Por otro lado, tenemos el crecimiento y cebo intensivo a base de una alimentación de piensos compuestos y animales estabulados. Además, existen otros sistemas como es el cebo en campo donde el animal permanece en libertad suplementando su alimentación o bien alimentado exclusivamente de piensos.



Figura 8: Cerdos ibéricos pastando en la dehesa.

2.2. Concepto de calidad de la carne de cerdo ibérico

Al definir el concepto de la calidad de la carne de cerdo ibérico se debe tener en cuenta que no existe un único concepto y la definición va a depender de diferentes componentes según la perspectiva que se tenga durante el proceso de obtención y la finalidad a la que se vaya a destinar la carne (Mohino, 1993; Ruiz et al., 2006).

De esta manera, se encuentran descripciones en función de la calidad en la producción, de las características tecnológicas y de aspectos sensoriales, nutricionales y/o sanitarios. Otros conceptos relacionados con la carne podrían ser la calidad culinaria y económica e incluso se puede citar la calidad ética donde se valoran aspectos relacionados con la sostenibilidad, biodiversidad, el empleo de lo natural y razas autóctonas con manejos extensivos, bienestar animal, etc.

2.2.1. Calidad productiva

La calidad productiva se determina a través de parámetros relacionados con el crecimiento, consumo, índice de conversión, homogeneidad de los lotes y rendimientos donde se tienen en cuenta el peso de la canal, rendimientos de la canal y de las piezas cárnicas nobles, así como la proporción de magro, grasa y hueso de la canal (Mohino, 1993; Ruiz et al., 2006).

La raza ibérica destaca por su elevado carácter adipogénico por lo que no cuenta con buena conformación cárnica. Por esta razón presentan características productivas desfavorables en comparación con otras razas porcinas destinadas a la producción de carne en fresco que persiguen la producción de canales con el máximo porcentaje de músculo y el mínimo de huesos y desechos de grasa. Sin embargo, el cerdo ibérico como materia prima requiere unas características peculiares a la hora de evaluar la calidad de la canal del animal. Las piezas nobles (jamón, paleta y lomo) que van a ir destinadas a la producción de productos crudo-curados, son las que reciben mayor importancia. Se persigue obtener menores rendimientos, con canales con mayor porcentaje en grasa debido a que implican piezas nobles con mayor grasa infiltrada y por lo tanto mayor calidad en sus productos curados (Cava et al., 2000; Cernadas et al., 2002).

2.2.2. Calidad tecnológica

La calidad tecnológica se centra en las características que van a influir en la conservación y/o procesado y está directamente relacionada con las posteriores características organolépticas del jamón u otros productos curados. Entre estas características podemos citar la capacidad de retención de agua (relacionada con las pérdidas de peso durante el procesado), el potencial oxidativo (relacionado con la susceptibilidad de originar procesos oxidativos y enranciamientos), el pH (Maltin et al., 2003), la estabilidad del color y la consistencia de la grasa (Bejarano, 2001). También influyen en la calidad tecnológica aspectos de los perniles como el peso y el grado de engrasamiento debido a que determinan la duración del salado y del proceso de secado al influir directamente en la velocidad de la pérdida de agua (Cava y Andrés, 2001) y se asocia de manera positiva a la calidad organoléptica de los productos ibéricos (López-Bote, 1998).

2.2.3. Calidad sensorial

Las características sensoriales constituyen el principal objetivo en todos los eslabones de la cadena productiva ya que la producción del cerdo ibérico se destina principalmente a la elaboración de productos curados diferenciados por sus sensaciones en boca.

La calidad sensorial tiene en cuenta aspectos relacionados con la percepción del consumidor el cual busca un notable veteado y un color intenso a la hora de adquirir carne fresca que una vez cocinada tenga una textura agradable, jugosidad y sabor característico. La calidad productiva y tecnológica de la carne influyen en las características físicas y composición química lo que derivan en diferentes sensaciones en el momento de consumirla (Pearson, 1994).

El contenido, la composición y estructura de la grasa intramuscular son determinantes para los atributos de aspecto, textura y aroma, así como para el tipo de elaboración, condiciones y duración de los procesos en el caso de productos curados (Lorido et al., 2015; J. Ventanas, 2008). Mayores porcentajes de grasa infiltrada dan lugar a menores valores de dureza y fibrosidad en los productos curados (Ruiz y López-Bote, 2002).

2.2.4. Calidad higiénico-sanitaria y nutricional

La calidad higiénico-sanitaria hace referencia a la inocuidad del producto, estando libre de contaminaciones bióticas y abióticas y sin riesgos sanitarios. También se da importancia a aspectos relacionados con el bienestar animal en los sistemas de crianza y manejo en el momento del sacrificio. Hoy en día los métodos seguidos por las industrias a lo largo de toda la cadena de producción están basados en asegurar esta calidad mediante una correcta trazabilidad y un sistema de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (APPCC).

La calidad nutricional se basa en el estudio de los nutrientes y macronutrientes que aporta la carne (proteínas, hidratos de carbono y lípidos) y los micronutrientes (vitaminas y minerales).

La valoración de la calidad nutricional se puede ver condicionada por las características de las producciones tradicionales del cerdo ibérico, cuyos productos se caracterizan por un alto contenido en grasa intramuscular y alto contenido en sal. Estos parámetros son valorados positivamente desde el punto de vista de la calidad sensorial y tecnología y a su vez son valorados negativamente desde el punto de vista nutricional. Esta contradicción se ha podido

observar en la propuesta de clasificación de los productos curados en el etiquetado Nuri-score generando una cierta polémica y confusión en el sector del cerdo ibérico (Szabo de Edelenyi et al., 2019).

Aun así, son muchos los expertos que han recomendado este producto en dietas saludables debido a su alto porcentaje de Ácidos Grasos Monoinsaturados (AGM) que permiten disminuir los niveles de colesterol en sangre, reduciendo la probabilidad de padecer enfermedades cardiovasculares (Kris-Etherton et al., 2000; Mattson y Grundy, 1985).

2.3. Factores que influyen sobre la calidad del cerdo ibérico

El actual reto que persigue el sector industrial y el área científico tecnológica es buscar justificaciones a diversos factores que influyen sobre la calidad final de la carne y de los productos del cerdo ibérico, para llevar a cabo su aplicación y manejo. El manejo de los diferentes factores siempre va orientado a una mayor rentabilidad sin perder calidad. Las piezas nobles son las de mayor valor económico suponiendo un 80-90% del valor total de la canal, aunque solamente suponen un 25-30% del peso de la canal.

A continuación, se describen una serie de factores que condicionan la calidad de la carne y de los productos elaborados orientados a la raza ibérica siendo la alimentación el principal factor.

2.3.1. Raza

La raza es un factor que determina la calidad productiva relacionada con los rendimientos de la canal, diferencias en la precocidad, diferencias en la cantidad de pigmentos hemínicos en el músculo y especialmente en la cantidad y distribución de la grasa intramuscular propiciando la obtención de diferentes calidades en la carne. En numerosos estudios se ha indicado que las razas o cruces comerciales seleccionados para una producción cárnica presentan mejores potenciales de crecimiento y mayores rendimientos en piezas nobles que el caso de las razas tradicionales (Barba et al., 2000; Morales et al., 2002; Ramírez y Cava, 2007; Serra et al., 1998).

Como ya se ha mencionado anteriormente, la raza ibérica está integrada por diferentes estirpes o líneas genéticas. Estas líneas se comportan de diferente manera en diferentes aspectos productivos. La línea Torbiscal destaca por el mejor comportamiento reproductivo mientras que la variedad Lampiño es la que presenta índices más bajos en cuanto a reproductividad (Serenio et al., 2002).

Son diversos los estudios llevados a cabo sobre el rendimiento de la canal en función de las variedades del cerdo ibérico. Las variedades negras de la raza Ibérica son más precoces que las coloradas y presenta mayores rendimientos a la canal (Barba et al., 2000).

La raza autóctona del cerdo ibérico se caracteriza por la capacidad adipogénica y la rusticidad que hace que se adapte al tradicional sistema de producción. Las canales de estos animales se caracterizan por alcanzar un 55-60% de grasa en canal con espesores de la grasa subcutánea dorsal de hasta 15 cm y un 10-13 % de grasa intramuscular (López-Bote, 1998; Mayoral et al., 1999) lo que determina la calidad de los productos derivados (López-Bote, 1998). La influencia

de las estirpes en aspectos relacionados con la calidad tecnológica y sensorial en cuanto a la deposición de grasa intramuscular no muestra una tendencia clara. Juárez et al. (2009) señalaron influencias significativas en cuanto a la cantidad de grasa intramuscular con mayores porcentajes en la estirpe Lampiña frente a la entrepelada, la Retinta y Torbiscal. Sin embargo, Estévez et al. (2003) no encontraron diferencias significativas entre las estirpes Lampiño, Torbiscal y Retinto.

La tendencia a usar el cruce con raza Duroc conlleva atenuar las diferencias en los parámetros reproductivos y de calidad productiva lo que incrementa los beneficios de los ganaderos (Benito Bernáldez et al., 2001; Espárrago Carande, 1998; López-Bote, 1998). Además, este cruce mejorante se adapta bien a las condiciones climáticas adversas por las que atraviesa en el régimen de alimentación tradicional. A pesar de los mayores beneficios que aporta la producción de animales cruzados la crianza en pureza sigue siendo de interés para asegurar la máxima calidad de los productos del cerdo ibérico (J. Ventanas, 2001).

Las canales de cruces de Duroc x Ibérico contienen menor espesor en la grasa dorsal y menor contenido de grasa intramuscular que la raza ibérica pura. Este hecho puede condicionar aspectos relacionados con la ternura, jugosidad y brillo de la carne fresca y de los productos curados. Por este motivo la raza pura se asocia con una mayor precocidad al tener una deposición mayor para la misma edad (M.P. Serrano et al., 2008; S. Ventanas, Estevez, et al., 2006; S. Ventanas, Ventanas, et al., 2007). Otros estudios han comprobado que los cerdos cruzados con Duroc sacrificados a mayores pesos alcanzan los mismos niveles de grasa en músculo que los ibéricos puros (Juárez et al., 2009). En cuanto a los rendimientos de la canal no se han observado diferencias significativas a pesar de que se reduce la grasa en la canal y aumenta el magro (Aparicio, 1987; Espárrago et al., 2001) por el contrario sí se han observado diferencias significativas en el peso y proporción en la canal de jamones, paletas y lomos (Aparicio, 1987; Dobao et al., 1987; Espárrago et al., 2001).

El porcentaje de pureza también presenta ligeras diferencias en el perfil lipídico de la grasa. En animales cruzados (Ibérico x Duroc) se observa menor porcentaje de AGM y mayor de Ácidos Grasos Saturados (AGS) que en ibérico puro (S. Ventanas, Ventanas, et al., 2006).

2.3.2. Sexo y castración

El sexo está ligado a la práctica de castración que influye notablemente tanto en la calidad sensorial de la carne como en calidad tecnológica y productiva, ya que se relaciona con el porcentaje de grasa subcutánea de las canales y los índices de conversión.

En primer lugar, para el factor del sexo no se han observado diferencias en cuanto al rendimiento en la canal y espesores grasos entre machos y hembras (Mayoral et al., 1999; Ramírez y Cava, 2007; Serra et al., 1998). El sexo no tuvo efecto sobre la composición de ácidos grasos para la grasa subcutánea ni para la grasa infiltrada en diferentes músculos (Ramírez y Cava, 2007). Sin embargo, sí se han descrito diferencias sobre los rendimientos de las piezas nobles de los machos y hembras ibéricos en sistemas de crianza en extensivo (Flores et al., 1988; Ruiz, Ventanas, et al., 1998).

En segundo lugar, la práctica de la castración se lleva a cabo en el 100% de los cerdos machos destinados a cebo con el fin de evitar olores y sabores desagradables (olor sexual) tanto en la carne fresca como en los productos curados. La castración también tiene otras ventajas como evitar conductas de monta y la reproducción no deseada en sistemas extensivos, así como reducir los comportamientos agresivos y las consecuentes bajas o individuos heridos. También se ha observado que en castraciones tempranas los cerdos machos aumentaban la ingestión voluntaria de alimento produciéndose un aumento del contenido de grasa con un menor rendimiento de la canal al reducirse la carne magra.

En el caso de las hembras ibéricas, esta práctica ha sido habitual debido a que históricamente se castraba a las hembras para que no pudieran ser cubiertas por los jabalíes en regímenes extensivos. Posteriormente se ha seguido realizando para evitar comportamientos no deseados de monta, facilidad del manejo y evitar la reducción de la ingestión de alimento durante la fase de celo. Son diversos los estudios llevados a cabo en relación a esta práctica por consideraciones basadas en bienestar animal, costes y factores productivos (Gómez-Fernández et al., 2013; M. P. Serrano et al., 2009). Algunos estudios han puesto de manifiesto el desarrollo de olores desagradables en canales de cerdas enteras y una menor calidad de la carne (Bonneau et al., 2000; Ellis, 1993; Gómez-Fernández et al., 2013).

Las cerdas ibéricas castradas quirúrgicamente se caracterizan productivamente por un mayor consumo de pienso, mayor Ganancia Media Diaria (GMD) y peores resultados en eficiencia alimentaria justificados por contener un mayor porcentaje de grasa en la canal sin encontrar diferencias entre el peso de jamones y lomos (M.P. Serrano et al., 2009). Gomez-Fernández et al. (2013) observaron que entre los 45 y 163 kg de peso las cerdas castradas quirúrgicamente aumentaban de peso al mismo ritmo que las enteras, pero consumían más pienso con diferencias significativas en cuanto a los índices de conversión.

En cerdos ibéricos cruzados (75% ibéricos), tanto machos como hembras y cebados en intensivo se encontró mayor peso de las piezas nobles y menor espesor de tocino dorsal en las hembras enteras que en los machos y hembras castrados sin encontrar diferencias en la cantidad de grasas infiltrada en el lomo (M.P. Serrano et al., 2008). Ramírez y Cava (2007) no encontraron diferencias en la GMD durante el periodo de acabado entre machos y hembras castradas de cruce Duroc x Ibérico.

Por cuestiones de bienestar animal, la castración quirúrgica de los animales está siendo cuestionada. Como principal alternativa ha surgido el desarrollo de vacunas con el fin de inmunocastrar tanto a machos como a hembras. Son diversos los estudios que han llevado a cabo comparativas productivas de ambos tipos de castración y calidad de la carne (García et al., 2018). Gómez-Fernández et al. (2013) llevo a cabo un estudio comparativo entre hembras Ibéricas castradas, enteras e inmunocastradas con las vacunas Improvac®. Las hembras castradas obtuvieron rendimientos de la canal significativamente inferiores a pesar de estar menos engrasadas y a su vez se tuvieron mayores rendimientos de jamones, paleta y lomo.

2.3.3. Edad y peso al sacrificio

Las características de la raza Ibérica referentes al crecimiento junto con el sistema productivo tradicional han derivado en edades tardías de sacrificio de los animales (10-14 meses dependiendo el sistema productivo) y pesos elevados (150 - 180 Kg Peso Vivo) contribuyendo a favorecer atributos de calidad como el color y canales con alto porcentaje de grasa infiltrada (Bonneau y Lebret, 2010).

La edad y el peso son factores que influyen notablemente en la capacidad lipogénica de los cerdos que tiene lugar en la última fase de crecimiento encontrando que, en diversas razas porcinas como la ibérica, se alcanza el máximo potencial a pesos más elevados (Mourot y Kouba, 1998). Por este motivo la edad al sacrificio es criterio de certificación en diversas Denominaciones de Origen como en el jamón de Parma (Italia) o el jamón Ibérico (España). En el caso del jamón ibérico se establece un mínimo de 14 meses de edad para los animales cebados en montanera y de 12 meses de edad para los cebados a base de piensos compuestos (RD 4/2014). Con periodos más prolongados en la raza ibérica se asegura que de que el animal haya depositado una mayor cantidad de grasa intramuscular.

Sin embargo, pesos elevados y edades tardías en el sacrificio afecta negativamente a la calidad productiva debido a que la GMD disminuye y por lo tanto empeora el índice de conversión (Latorre et al., 2004). Si valoramos los efectos de edad y peso al sacrificio sobre la calidad productiva encontramos que mejoran los rendimientos de la canal a medida que aumenta el peso vivo y la edad, pero con una disminución del porcentaje en peso de las piezas nobles respecto al peso de la canal (Daza, Mateos, et al., 2006; Espárrago et al., 2001; Mayoral et al., 1999). Esto es debido a que el crecimiento de las partes nobles es inferior al crecimiento de la canal total (Espárrago et al., 2001). El contenido en grasa de cobertura de la canal aumenta a medida que los animales aumentan de peso, así como el porcentaje de grasa intramuscular y el contenido de mioglobina en la carne. Todo ello conlleva la mejora de la calidad sensorial tanto de la carne fresca como del producto elaborados (López Bote et al., 2000; Mayoral et al., 1999).

Estudios recientes se han centrado en el estudio del impacto de la edad de los cerdos ibéricos cruzados a la entrada en montanera sobre parámetros productivos en la fase de cebo y en la calidad de la canal. Ortiz et al. (2021) determinó que los animales de mayor edad a la entrada de montanera alcanzan mejores parámetros productivos durante este régimen de cebo, pero un menor rendimiento. Daza et al. (2006; 2007) observaron que la edad de entrada en montanera influyó significativamente en una menor reposición del peso de los animales con 100 kg peso vivo y edades de 8 meses frente a los de 12-14 meses. La calidad de la grasa también fue menor para los animales más jóvenes obtenido mayores proporciones de AGS totales en la grasa subcutánea.

También se ha determinado que la edad en el momento del sacrificio influye en la grasa intramuscular. Bosch et al. (2012) y Rodríguez-Sánchez et al. (2010) determinaron que en cerdos de raza Duroc e Ibéricos respectivamente, con la edad aumentaba la cantidad de grasa intramuscular en el musculo *Longissimus dorsi* y por el contrario el espesor de la grasa dorsal disminuía en la canal a mayor edad del cerdo. En raza ibérica y otras razas de cerdos blancos no autóctonos se ha observado el mismo comportamiento (Daza, López-Bote, et al., 2007; Latorre

et al., 2003). También se ha visto una relación positiva en cuanto a la edad de sacrificio de los cerdos ibéricos y la calidad del lomo observándose mayores porcentajes de ácidos grasos insaturados, mayor contenido en tocoferoles y mayor cantidad de colágeno insoluble lo que se traduce en una mayor dureza de la carne (Ortiz et al., 2020).

2.3.4. Ejercicio físico

El ejercicio físico del cerdo ibérico está relacionado con los sistemas de explotación extensivos y semi-extensivos. Actualmente se les asigna una calidad diferenciada a los productos provenientes de estos sistemas productivos dando mayor importancia a instalaciones con mayor superficie por animal y superficies al aire libre, lo que posibilita mayor ejercicio (Millet et al., 2005).

Es evidente, que el animal que realiza ejercicio físico va a presentar menores rendimientos productivos y por ello un peor índice de conversión. Independientemente del ejercicio que realice el animal debemos tener presente que la GMD va a estar influida por otra serie de factores como son los aportes proteicos en la dieta, las tasas de crecimiento de la raza porcina (Wood et al., 2013), el peso corporal del animal cuando se le somete a restricciones proteicas (Li et al., 2018) y las deficiencias en los niveles proteicos y aminoácidos esenciales (Madeira et al., 2013).

Varios estudios han encontrado tendencias a mayor rendimiento de la canal en animales sedentarios (López-Bote et al., 2008) e incluso diferencias significativas de la GMD entre los cerdos ibéricos criados en libertad y los criados en confinamiento asociadas al efecto de la actividad física y a las condiciones climáticas (Lachica y Aguilera, 2000; López-Bote et al., 2001). En cambio, Daza et al. (2010) observaron que el acabado de cerdos con mayor espacio para hacer ejercicio (cerdos de campo en parques al aire libre) o menor espacio para hacer ejercicio (cerdos de cebo estabulados) no influyó significativamente en las características de la canal para cerdos ibéricos.

En cuanto a los efectos en la calidad de la carne, es conocido que el ejercicio de los cerdos potencia las coloraciones más rojas debido al mayor contenido en mioglobina y a un aumento de fibras musculares oxidativas, características de los cerdos criados en sistemas extensivos por el ejercicio físico (S. Ventanas et al., 2005). Estos compuestos hemínicos tienen un papel importante en la regulación de reacciones de oxidación que van a dar lugar al desarrollo de aromas y sabores característicos durante el procesado (J. Ventanas, 2012).

2.3.5. Sistema de producción y alimentación

El sistema de producción y especialmente la alimentación son los factores extrínsecos que determinan finalmente la síntesis y la composición de la grasa y por ende la calidad final de los productos cárnicos derivados del cerdo ibérico. Esto se debe a que el cerdo es un animal monogástrico, lo que le permite llevar a cabo digestiones rápidas que no transforman los principales componentes nutricionales y los deposita sin apenas sufrir alteraciones (Cava et al.,

1999; Lebret, 2008). Por ello, la grasa refleja el tipo de alimentación en su última etapa de vida (Lebret, 2008). Otro de los aspectos relacionados con las características de la grasa de la canal es el tiempo de reemplazo de los depósitos de grasa en porcino, siendo de 60 a 150 días o más, influenciado directamente por la dieta recibida en este periodo previo al sacrificio (Cava et al., 1999; Ruiz y Petró, 2000). Este largo periodo indica que la alimentación en la fase previa al cebo también tiene influencia dado que el periodo de montanera en algunos de los casos es muy corto (60 días mínimo para el cumplimiento de la norma de calidad actual) (RD 4/2014).

La alimentación en la etapa de premontanera ha experimentado una transformación ya que tradicionalmente en recría no se aportaba alimentación a los animales, únicamente lo que aportaba el campo. En los últimos años la tendencia se basa en aportes complementarios de pienso en campo debido a que permite alcanzar objetivos más exigentes en el momento del sacrificio y asegura la entrada en montanera de lotes de animales más uniformes, vigilando aspectos importantes como es el engrasamiento en la fase de crecimiento y la realización de ejercicio.

En la producción de cerdos ibéricos el sistema de alimentación tradicional en la fase de cebo ha sido la montanera, dieta que se caracteriza por ser muy rica en grasas e hidratos de carbono con un contenido proteico muy bajo y con un perfil de aminoácidos desequilibrado con el aporte en lisina como principal aminoácido limitante (García-Valverde et al., 2007; Nieto et al., 2002). La mayoría de los estudios han indicado que los animales alimentados en montanera a partir de bellota y pasto tienen mayor tendencia a acumular grasa respecto a alimentaciones suplementadas con piensos (Andrés et al., 2001; S. Ventanas, Estevez, et al., 2006; S. Ventanas et al., 2008) a pesar de que Carrapiso y García (2005) y Daza et al. (2009) no evidenciaron los mismos efectos. Este mayor engrasamiento está justificado por la estimulación de la actividad enzimática de síntesis de grasa debido al alto contenido de carbohidratos en la bellota (Mourot y Kouba, 1998) y al tipo de carbohidratos (Hudgins et al., 2000). Además, el nivel de grasa en la dieta va a condicionar la procedencia de síntesis de la grasa encontrándose que en dietas muy grasas se disminuye la síntesis endógena (Hudgins et al., 2000; Smith et al., 1996) debido a la inhibición de la síntesis de enzima acetil-CoA carboxilasa. En este caso los ácidos grasos depositados procederán fundamentalmente de los recibidos mediante la dieta (Wood, 1984). Por ello, la grasa de los cerdos ibéricos cebados en montanera se caracteriza por un alto porcentaje en AGM en el perfil lipídico de la grasa (50-65%), siendo el oleico (C18:1) el principal al estar presente en mayor proporción en la composición de las bellotas y bajos contenidos en linoleico (C18:2 n-6). Todo ello indica que es posible modificar el perfil en ácidos grasos mediante el manejo de la dieta (Tejeda et al., 2002; S. Ventanas, Ruiz, et al., 2007).

La estructura química de los ácidos grasos de la alimentación también va a influir sobre la síntesis lipídica, de manera que Smith et al. (1996) observaron que los ácidos grasos procedentes del alimento que estaban compuestos por ácidos grasos de cadena corta-media se depositaban en menor medida. Además, Mourot y Kouba (1998) observaron que la insaturación de la grasa dietética incrementaba la deposición de la grasa corporal encontrando diferencias estadísticamente significativas en el incremento de síntesis de grasa subcutánea en función de la cantidad de ácido linoleico (C18:2).

La duración del periodo en el que el animal está en montanera también va a resultar influyente en la calidad de la carne, afectando principalmente al contenido en ácidos grasos. Ayuso et al. (2020) encontró en la grasa subcutánea un mayor porcentaje de ácido graso oleico (C18:1), gadoleico (C20:1) y AGM y menor porcentaje de ácido margárico (C17:0), palmitoleico (C16:1), margaroleico (C17:1), linoleico (C18:2), linoléico (C18:3) y Ácidos Grasos Poliinsaturados (AGP) a medida que aumentaba el tiempo en montanera.

Por otro lado, las dietas basadas en piensos compuestos comerciales se caracterizan por altos aportes en hidratos de carbono y bajos en grasa lo que tiende a incrementar la síntesis de grasa endógena (Hudgins et al., 2000; Smith et al., 1996) viéndose este hecho reflejado en el perfil de ácidos grasos, con un mayor contenido de AGS como el palmítico (C16:0) y el esteárico (C18:0). En cuanto al contenido en grasa en la canal es menor en comparación con alimentaciones basadas en montanera. Esto se debe al bajo aporte de grasa en la dieta y a que los sacrificios se realizan a edades más tempranas sin alcanzar niveles máximos en acúmulos grasos.

Como se ha comprobado a lo largo de los años, el remplazo de los regímenes de alimentación tradicionales en mayor o menor grado influye en las características de la materia prima y produce una disminución de los atributos sensoriales de los productos curados disminuyendo su aceptabilidad (Carrapiso et al., 2003; García et al., 1996). Por ello, son muchas las investigaciones llevadas a cabo en el sector que persiguen la búsqueda de estrategias en nutrición animal que permitan alcanzar productos competitivos con calidades comparables a los productos de categoría de bellota. Todas ellas se han centrado principalmente en el estudio de la influencia de la dieta en el perfil de ácidos lipídicos, en la capacidad de infiltración de la grasa y en el rendimiento (Alfaia et al., 2019). Las estrategias han ido evolucionando según se han ido implementando diferentes sistemas de control y se han ido evaluando los resultados tanto en la materia prima como en las cualidades organolépticas del producto final.

La estrategia más empleada fue la utilización de piensos enriquecidos con Ácidos Grasos Insaturados (AGI). Se ha observado que esta práctica conlleva graves defectos sobre los productos curados derivados del cerdo ibérico debido a la temprana oxidación de los AGP y al hecho de no tener antioxidantes naturales. Esto ocasiona aromas indeseables a rancio perdiendo calidad durante los largos procesos de curación (S. Ventanas, Estévez, et al., 2006; S. Ventanas et al., 2008).

La búsqueda de solución a las reacciones de oxidación en los productos derivados de animales cebados con piensos se ha encaminado a modificar la composición de los ácidos grasos de la dieta, disminuyendo los AGI y/o incorporando suplementación de compuestos con efecto antioxidante (vitamina E) que se depositarán en las membranas celulares reduciendo la susceptibilidad de los fosfolípidos a la oxidación (Decker et al., 2000).

Zhang et al. (2021) puso de manifiesto que la adición de calcio en la dieta favorece la acumulación de grasa intramuscular tras inhibir la oxidación de los ácidos grasos. En este campo, la investigación en la búsqueda de nuevas estrategias para la mejora de la calidad de la carne mediante el aumento del contenido en grasa intramuscular esta activa hoy en día.

Las estrategias llevadas a cabo para favorecer el contenido de la grasa intramuscular se basan en ayunos prolongados previos a la entrada a la fase de cebo y el manejo de suplementación o

reformulación de nutrientes en la dieta durante la fase previa al sacrificio (Alfaia et al., 2019; Andrada, 2006; García-Valverde et al., 2008; Lebret, 2008).

Cuando la restricción tiene lugar en animales con temprana edad o pesos bajos se puede producir un efecto indeseado que provoca un desarrollo inadecuado del tejido muscular reduciéndose el número de fibras musculares (Andrada, 2006). Lo que se persigue con esta práctica es llevar a cabo un crecimiento compensatorio después de someter al animal a una fuerte restricción alimentaria con mínimas o nulas ganancias medias diarias por la actividad física y los efectos climáticos (Daza, 2001). En respuesta se genera un aumento significativo del consumo de pienso con mayor GMD lo que mejora el índice de conversión global y se traduce en mejores resultados económicos. Los mecanismos metabólicos responsables del crecimiento compensatorio en el cerdo son mayormente desconocidos. Durante el periodo de restricción se reducen las necesidades de mantenimiento, el catabolismo de las proteínas y el peso de las vísceras y parece que la reducción del catabolismo proteico se prolonga durante cierto tiempo en la fase de realimentación posterior (Whang et al., 2003). A su vez, el organismo del animal va a tener un mejor aprovechamiento de la alimentación al tener un mayor desarrollo de la capacidad fermentativa del intestino grueso siendo capaz de sintetizar grasa de mayor calidad derivada de la ingestión de bellota y pasto (López-Bote et al., 2001). De esta forma se observa un crecimiento significativamente mayor del tejido adiposo y de las vísceras que del magro de la canal (Lebret, 2008; Skiba et al., 2002).

Otras investigaciones se han centrado en estudiar la influencia de la relación proteína/energía observando que bajas proporciones de proteína dan lugar a canales con mayor contenido de grasa total. Si observamos la dieta por excelencia, la montanera, se caracteriza por un aporte deficitario de proteína por parte de la bellota que se intenta compensar con el consumo de hierba mostrando ser insuficiente (García-Valverde et al., 2008). Como ya se ha dicho anteriormente, como los aportes de proteína de la dieta están por debajo de las necesidades del animal, este no puede expresar un crecimiento magro y en su defecto el exceso de energía lo depositará en forma de grasa. Son diversos los estudios que han observado este aumento de grasa corporal por aportes mínimos de proteína en la dieta (Andretta et al., 2014; Pomar et al., 2014; Rodríguez-Sánchez et al., 2011; Ruusunen et al., 2007; Wood et al., 2004). Cisneros et al. (1996) y Gondret y Lebret (2002) consiguieron incrementar la cantidad de grasa intramuscular en un 33% y 40% respectivamente mediante aporte de dietas lisina-deficientes (como también lo es la dieta en montanera). El inconveniente de estas estrategias es la elevada cantidad de energía que se deriva a la generación de grasa subcutánea al mismo tiempo que se incrementa la proporción de grasa intramuscular (Lebret, 2008). Este efecto es menor en la grasa de la canal que en la grasa intramuscular depositada (Essén-Gustavsson et al., 1994; Wood et al., 2004).

La mencionada estrategia proteína/energía se puede orientar de forma inversa a lo anteriormente citado, debido a que una dieta con elevado contenido en proteína y grasa disminuye la síntesis endógena de ácidos grasos (Allee et al., 1971). La suplementación en este caso con materias primas ricas en proteína (salvado o soja) es común en montaneras con escasa disponibilidad de hierba o en el caso de querer canales menos grasas con mayor porcentaje de magro y proporciones de las piezas nobles (Aparicio, 1987).

2.3.6. Manejo pre-sacrificio y post-sacrificio

Actualmente el bienestar animal es un atributo diferenciador que ha ido adquiriendo mayor importancia a lo largo de los últimos años y se tiene muy en cuenta en toda la cadena de producción animal en todo el mundo (Velarde y Dalmau, 2012). La etapa previa al sacrificio es un punto de especial atención por el estrés que le supone al animal afectando el bienestar animal y a su vez supone un momento crucial para que no se vea afectada la calidad de la carne lo que conlleva pérdidas económicas.

Los principales factores que influyen en el manejo de los animales son el bienestar animal durante el proceso de producción, transportes al matadero, ayunos prolongados y manejos inadecuados durante las etapas de pre-sacrificio. Un manejo incorrecto de estos factores influye en mayor o menor medida en posibles defectos en la canal (fracturas de articulaciones, hematomas, hemorragias...) que disminuyen su valor comercial (Gispert et al., 2000; Guàrdia et al., 2009). Estos factores influyen así mismo en la evolución del pH de la carne lo que afecta de forma directa a parámetros físico - químicos como el color, la capacidad de retención de agua, las pérdidas por goteo y cocción, la textura y las propiedades funcionales de las proteínas miofibrilares (Hughes et al., 2014).

En el cerdo ibérico se observa un número importante de animales con pH finales post-sacrificio ligeramente superiores a 6,0 dando lugar a carnes oscuras, firmes y secas; (Dark, Firm, Dry; DFD) debido a ayunos prolongados y manejos bruscos en el manejo previo al sacrificio.

Las carnes pálidas, blandas y exudativas (Pale, Soft, Exudative; PSE) y DFD condicionan y limitan la producción de derivados cárnicos ya que no cumplen los parámetros óptimos de las técnicas requeridas en su procesamiento, afectan negativamente en el rendimiento de la canal y se limita su comercialización al no ser aceptadas por el consumidor (Barbut et al., 2008).

El manejo de los ayunos es crucial para evitar pérdidas de rendimiento del canal debido, principalmente, a la pérdida de agua corporal, así como las condiciones ambientales y tiempos de oreo. El rendimiento ($[\text{peso de la canal fría}/\text{peso al sacrificio}] * 100$) se ve afectado cuando las temperaturas de la cámara de oreo se sitúan por encima de los 4°C y humedades relativas inferiores al 85% (Buxadé, 1984). Cisneros et al. (1996) y Lebret et al. (2001) han observado que las pérdidas de peso de la canal en el oreo disminuyen al aumentar el peso y el estado de engrasamiento de la canal.

3. MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA AUTENTICIDAD DEL GENOTIPO Y RÉGIMEN ALIMENTICIO EN EL CERDO IBÉRICO

Las asociaciones vinculadas al cerdo ibérico, así como los productores e industriales y la propia administración han buscado siempre una forma de garantizar la autenticidad de productos de cerdo ibérico. El interés por la autenticidad de los alimentos en la sociedad ha ido en aumento y se ha convertido en una prioridad para la industria alimentaria desde la producción hasta la distribución (Hong et al., 2017). En la actualidad es crucial el desarrollo e investigación de técnicas analíticas precisas que contribuyan a garantizar la autenticidad de productos alimenticios en general (Alonso et al., 2008; Ballin, 2010; Hassoun et al., 2020; Hong et al., 2017).

Las metodologías de autenticación en el sector ibérico van orientadas a estudiar los parámetros que permitan diferenciar las categorías comerciales en función de la alimentación animal sin olvidar que estos parámetros también pueden verse influenciados por otros factores como la raza, sexo o edad. La grasa del animal ibérico tiene un papel muy importante debido a que está ligada directamente con la alimentación aportada al animal en el último periodo de engorde y va a condicionar las características finales de la canal y de los productos curados (Andrés et al., 2001; Lorigo et al., 2015; J. Ventanas, 2008; S. Ventanas et al., 2005). Por esta razón, la mayoría de las metodologías que se describirán a continuación se centran en la cuantificación de componentes específicos o en el comportamiento de las características físico - químicas de la grasa para distinguir los tipos de alimentación y la raza. Las diferentes metodologías han ido evolucionando con el fin de encontrar herramientas con menor error posible y que no sean manipulables con estrategias de suplementación de piensos.

En el presente apartado se detallan las técnicas empleadas en el sector ibérico a lo largo de la historia. Dado que en la presente Tesis Doctoral se utiliza la Espectroscopía en el Infrarrojo Cercano (NIRS) como técnica de caracterización de las canales de cerdo ibérico, esta tecnología se describirá con mayor profundidad en el apartado 4 de la presente memoria.

3.1. Métodos basados en las propiedades físicas de la grasa

3.1.1. Sensación al tacto

La metodología consiste en el reconocimiento de la calidad de los productos del cerdo ibérico mediante la sensación al tacto sobre la grasa de cobertura de paletas y jamones. Es una de las primeras técnicas basadas en el comportamiento de la grasa y se relaciona directamente con la proporción de AGS e AGI depositados en la grasa subcutánea del animal y sus diferentes puntos de fusión (Dobao et al., 1987; Ruiz y Petró, 2000).

Cuando la sensación de la grasa era blanda y suave al tacto se asociaba con una alimentación en régimen de montanera (rica en AGM) mientras que si la sensación era de dureza se determinaba que los animales habían sido cebados a base de pienso (mayor proporción de ácidos grasos saturados).

El método fue fiable hasta que se incorporaron materias primas en la alimentación animal, como el maíz o la soja, que tienen un mayor contenido en AGI que las materias primas

tradicionalmente empleadas (leguminosas y cereales). Sin embargo, existen otros factores que condicionan la sensación de firmeza como la temperatura ambiente, la cantidad de colágeno y la experiencia del evaluador. La falta de otras técnicas no destructivas hizo que durante décadas esta práctica fuera aplicada en jamones y paletas de forma orientativa en la industria a pesar de su elevada subjetividad.

3.1.2. Punto de fusión

La medición de los puntos de fusión y deslizamiento fue la primera metodología de análisis que llegó a estar considerada como método oficial para la evaluación de la alimentación durante la etapa de cebo (BOE 1988).

La técnica se basa en el principio de la temperatura de fusión de la grasa, la cual va a depender de los ácidos grasos presentes debido a que cada uno de ellos tiene un punto de fusión diferente. A medida que aumenta el grado de insaturación la temperatura de fusión disminuye así se observa que los ácidos grasos esteárico (C18:0) y palmítico (C16:0) funden a temperaturas de 63 y 69°C respectivamente y el oleico, linoleico y linoléico funden a temperaturas de 13,4°C, -0,5°C y -10°C respectivamente.

El procedimiento más extendido por su simplicidad para determinar el punto de fusión fue el método de tubos capilares, método oficial de la Asociación Oficial de Química Analítica (AOAC), nº 920.157 (AOAC, 1990) en el que a medida que aumenta la presencia de AGI se registran menores puntos de fusión (López-Bote et al., 2001). En el año 1984 el Ministerio de Agricultura estableció los intervalos de temperatura de deslizamiento para los diferentes regímenes de alimentación que fueron entre 27-30°C para la grasa de cerdos alimentados en montanera, entre 30-30,5°C en el caso del régimen de recebo y superiores a 32°C para los animales terminados exclusivamente con pienso.

Sin embargo, otros estudios llevados a cabo con la misma técnica analítica encontraron temperaturas de deslizamiento variables para los distintos regímenes de alimentación (Dobao et al., 1987; Flores et al., 1988). Se concluyó que a pesar de ser una determinación sencilla y con mayor objetividad que las disponibles hasta ese momento, presentaba errores importantes asociados a la zona anatómica de donde se tomaba la muestra de grasa, a las condiciones de conservación de la muestra previo al análisis, así como a la preparación de la muestra (Casillas, 1995).

3.1.3. Índice de yodo

El índice de yodo es otro de los métodos usados para diferenciar la alimentación de los animales y también está relacionado con el grado de instauración de la grasa. Esta técnica ha sido implementada en otros tipos de grasas animales y vegetales y se basa en la determinación de la cantidad de yodo que reacciona con 100 gramos de grasa según el método de la AOAC nº 28.023 (AOAC, 1998). Un mayor número de dobles enlaces presentes en la muestra va a reflejarse en un mayor índice de yodo que, en el caso de los cerdos, se relaciona con animales alimentados a base de bellota en su última fase de vida.

El mayor inconveniente que presenta este método analítico es la facilidad para ser modificado con aportes de piensos enriquecidos con materias primas de alto contenido en AGP, obteniéndose índices de yodo muy similares a los registrados en la alimentación en montanera (bellota y pasto).

3.1.4. Otros métodos

Otras metodologías relacionadas con propiedades de la grasa son el análisis de textura, la Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) y la Difracción de Rayos X (XRD) mostrando todas ellas un gran potencial para clasificar alimentaciones y razas en el sector ibérico.

Bayés-García et al. (2021) concluyeron que las técnicas de caracterización polimórfica DSC y XRD pueden ser empleadas como herramientas de huellas dactilares para la autenticación de las categorías de cerdo ibérico bellota y cebo. Este trabajo determinó que el factor que más influye en el comportamiento polimórfico de los extractos lipídicos del cerdo ibérico es el aporte de bellotas y no el ejercicio físico que realiza el animal. En un estudio previo, Bayes-García et al. (2016) ya habían establecido el potencial de estas técnicas para diferenciar las categorías de ibérico bellota frente a cebo. Niñosles et al. (2007) encontraron diferencias significativas mediante análisis de textura, en concreto de punción, en la grasa dorsal entre animales ibéricos puros y cruzados (Ibéricos x Duroc) alimentados con el mismo tipo de pienso; presentando menor dureza el ibérico puro. Este estudio también permitió distinguir los diferentes regímenes de alimentación, concluyendo que los parámetros de textura dependían de la composición y estructura de la grasa a analizar. La combinación de la textura con otras técnicas como ultrasonidos permitió clasificar correctamente el 100 % de las muestras en función del tipo de alimentación.

3.2. Características químicas de la grasa

3.2.1. Determinación de ácidos grasos

La determinación de ácidos grasos fue incorporada como método de análisis oficial para clasificar las canales de cerdo ibérico en función del régimen alimenticio en la campaña 2004/2005 (RD 1083/2001-Anexo de la Orden APA/213/2003). La implementación de este análisis supuso un gran avance para el sector ibérico debido a su mayor objetividad frente a las técnicas oficiales empleadas hasta el momento (la temperatura de desplazamiento e índice de yodo). Su derogación se realizó en la campaña 2007-2008 (RD1469/2007), momento en el que se establecieron inspecciones en campo para certificar el régimen de alimentación.

Para llevar a cabo la clasificación de las canales en las categorías de bellota, recebo o cebo se establecían unos límites de porcentaje mínimo en la grasa subcutánea de algunos ácidos grasos: palmítico (C16:0), esteárico (C18:0), oleico (C18:1 n-9) y linoleico (C18:2 n-6). Estos niveles se actualizaban en cada campaña (Tabla 1) debido a que los perfiles lipídicos en la grasa subcutánea dependen de los recursos disponibles en la dehesa en cada temporada (Tejerina et al., 2011, 2012). Para asignar una muestra a una categoría, era de obligado cumplimiento superar los límites fijados para cada categoría para los cuatro ácidos grasos citados anteriormente.

Tabla 1: Porcentajes mínimos de los ácidos grasos recogidos en la legislación española, en los diferentes años en los que estuvo en vigor, para la clasificación de las canales.

CAMPAÑA	Oleico (C18:1)	Palmítico (C16:0)	Estearico (C18:0)	Linoleico (C18:2)
	Alimentación <<bellota>>			
04/05	≥ 54,0	≤ 21,3	≥ 9,8	≤ 9,8
06/07	≥ 53,0	≤ 22,0	≥ 10,5	≤ 10,5
07/08	≥ 53,0	≤ 22,0	≥ 10,5	≤ 10,5
	Alimentación <<recebo>>			
04/05	≥ 52,2	≤ 23,1	≥ 10,9	≤ 10,18
06/07	≥ 51,0	≤ 24,0	≥ 11,5	≤ 11,5
07/08	≥ 51,0	≤ 24,0	≥ 11,5	≤ 11,5

Los valores se determinaban mediante el análisis de una única muestra de grasa líquida extraída de un elevado número de muestras de grasas subcutáneas (dependiendo del tamaño del lote) y servía para clasificar todo el lote de animales, de modo que no es posible contemplar la variabilidad existente entre individuos.

La determinación del perfil de ácidos grasos (porcentaje en peso) se llevaba a cabo mediante el método definido por la AOAC nº 962.22 (AOAC, 1999) basado en la separación y cuantificación de los metil-ésteres de los ácidos grasos de 8 a 24 átomos de carbono procedentes de los triglicéridos y fosfolípidos. Previamente se requiere fundir la grasa y llevar a cabo una saponificación y posterior extracción con hexano para ser analizada por Cromatografía de Gases (GC). La metodología ofrece muy buenos resultados en cuanto a repetitividad y reproductibilidad entre los laboratorios (García-Olmo, 2002) lo que llevó a que fuera establecido como método oficial (Cava et al., 1997; Flores et al., 1988).

El perfil lipídico de la grasa subcutánea del cerdo ibérico depende principalmente de la dieta recibida en el periodo final de engorde y de la raza (Fuentes et al., 2014; Pérez-Palacios et al., 2010). Sin embargo, otros autores afirman que la raza apenas tiene influencia sobre el perfil lipídico (Niñoles et al., 2007). El análisis de ácidos grasos ha sido considerado una herramienta muy útil para diferenciar el régimen de alimentación durante la etapa de cebo (Flores et al., 1988; González-Domínguez et al., 2020; León-Camacho et al., 2009).

Los avances en nutrición animal hicieron posible desarrollar formulaciones de piensos que permitiesen alcanzar los porcentajes mínimos para la clasificación en categoría de bellota de modo que se obtenían un elevado número de falsos positivos. Algunos autores se plantearon si el empleo del perfil completo de ácidos grasos (no solamente cuatro ácidos grasos) podía ser

adecuado para distinguir las diferentes categorías. También la combinación del perfil lipídico con otros métodos analíticos fue estudiada obteniéndose resultados aceptables (Delgado Huertas et al., 2007; López-Vidal et al., 2008; Niñoles et al., 2007; Pérez-Palacios et al., 2010; Rey et al., 2006).

Otras limitaciones de este método son el elevado coste por muestra, la necesidad de disponer de instrumental analítico y personal especializado y altos costes de mantenimiento. Además, los resultados no siempre conducen a una discriminación satisfactoria (Porrás-Tejeiro et al., 2009).

Hoy en día es una determinación analítica que se sigue empleando ya que la composición de la grasa aporta información significativa sobre el manejo de las piezas nobles en las etapas de salazón y secado. Además, está relacionada con factores de calidad como la consistencia, el color y la oxidación de la carne tanto en producto fresco como curado (Cava y Andrés, 2001; Gilles, 2009; Melgar et al., 1991; Ruiz-Carrascal et al., 2000; S. Ventanas, Ventanas, et al., 2006).

3.2.2. Triglicéridos en grasa

Los triglicéridos de la grasa están presentes en un 86% en los tejidos adiposos de los cerdos ibéricos (Perona y Ruiz-Gutierrez, 2005), por ello, la determinación de triglicéridos en grasa ofrece resultados prometedores al igual que el tradicional análisis de ácidos grasos.

El método tradicional de cuantificación estaba basado en la técnica de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) (Díaz et al., 1996; Petrón et al., 2004; Tejeda et al., 2002). Años después se consiguió llevar a cabo el análisis mediante GC gracias al desarrollo de nuevas fases estacionarias que permitieron aumentar los componentes cuantificables (Gallardo et al., 2012; Narváez Rivas et al., 2009; Viera Alcaide et al., 2008; Viera-Alcaide et al., 2007). Este análisis conlleva el uso de productos químicos, temperaturas altas de trabajo y precisa una estandarización del instrumento. No obstante, esta determinación resulta más rápida que otros métodos analíticos (ácidos grasos, hidrocarburos o compuestos volátiles) porque los tiempos de derivación y recuperación son menores. La mayor simplicidad de esta metodología llevó a la creencia de que el tradicional análisis de ácidos grasos sería remplazado, pero en la práctica no resultó ser así (Ruiz y Petrón, 2000).

La principal aplicación de esta técnica ha sido la determinación de la composición de la grasa, estudiándose las correlaciones con la dieta durante el cebo tanto en sistemas intensivos y extensivos, así como la dependencia con el genotipo (Gallardo et al., 2012; Tejeda et al., 2002; Viera Alcaide et al., 2008). La mayoría de los estudios realizados encontraron efectos significativos de los factores relacionados con la alimentación como son la duración del periodo en montanera, así como la región anatómica muestreada (Garrido-Fernández y León-Camacho, 2021; Narváez Rivas et al., 2009; Viera Alcaide et al., 2008; Viera-Alcaide et al., 2007).

El contenido de triacilgliceroles de AGM es mayor en las muestras de grasa de animales alimentados en montanera que en los alimentados con pienso. Las dietas basadas en pienso reflejaron un mayor contenido de AGS por las proporciones más altas en ácido graso palmítico (C16:0) y esteárico (C18:0) en la ración (Cava et al., 1997, 1999; Díaz et al., 1996; Flores et al., 1988; Ruiz, Cava, et al., 1998; Tejeda et al., 2002).

Tejeda et al. (2002b) observaron efecto limitado del genotipo, encontrando diferencias significativas para algunos ácidos grasos menores como el mirístico (C14:0), heptadecanoico (C17:0) y palmitoleico (C16:1). No observaron un efecto significativo sobre las principales proporciones de AGS y el efecto significativo sobre las proporciones de oleico (C18:1 n-9) y linoleico (C18:2 n-6) se asoció con una interacción entre el genotipo y la dieta.

En general esta metodología ha tenido menor éxito en el sector cárnico y en el campo investigador que el análisis de ácidos grasos (Garrido-Fernández y León-Camacho, 2021).

3.2.3. Análisis de la fracción insaponificable de la grasa

La fracción insaponificable constituye una parte minoritaria (entorno al 1%) del total de la grasa. Está compuesta por hidrocarburos, esteroides, carotenoides y tocoferoles asociados con la ingesta de pasto y bellota en sistemas de alimentación de cerdos ibéricos en libertad (Hernández-Matamoros et al., 2013; Rey et al., 2013; Rey et al., 2006; Tejeda et al., 2001).

Esta fracción ha sido cuantificada en los tejidos del cerdo ibérico (grasa principalmente) para determinar la alimentación de los cerdos durante la fase de cebo, observando diferencias significativas en los diferentes compuestos de la fracción insaponificable (Cava et al., 1997; Hernández-Matamoros et al., 2013; Rey et al., 2006; Tejeda et al., 2001).

Una de las fracciones que mejores resultados presentó, en cuanto a la diferenciación de los tipos de alimentación, fue la fracción de los hidrocarburos ramificados, no siendo tan claras las diferencias encontradas para los hidrocarburos saturados. Son especialmente interesantes los estudios que determinan el hidrocarburo ramificado denominado **neofitadieno** ya que solo se encuentra presente en las muestras de cerdos ibéricos alimentados con bellotas y hierba, pero no en cerdos alimentados en confinamiento a base de pienso (Hernández-Matamoros et al., 2013; Pérez-Palacios et al., 2009; Petrón et al., 2005; Tejeda et al., 2001) debido a que es un componente exclusivo de los pastos (Tejeda et al., 2001). De hecho, existe una patente para la diferenciación de los cerdos ibéricos en función de la alimentación basada en el contenido de neofitadieno (Tejeda et al., 2005). Además, se ha encontrado una correlación positiva entre este compuesto y la duración del periodo en montanera (Hernández-Matamoros et al., 2013). A pesar de ser un método analítico tan prometedor, la complejidad y tiempo de análisis hacen que no se haya implementado como método de control en el sector ibérico (Ruiz y Petrón, 2000). Además del neofitadieno, el Ent-kaurene (hidrocarburo tetracíclico diterpénico) también ha sido analizado para autenticar los sistemas de alimentación (Rivas et al., 2008).

Otra de las fracciones insaponificables de interés son los **tocoferoles**, ya que estos se acumulan en los tejidos de estos animales. Los alimentos que consume el cerdo durante la montanera son ricos en α -tocoferoles en el caso de la hierba y de γ -tocopherol en el caso de la bellota incluyéndose ambos en las formas moleculares e isoméricas que constituyen la vitamina E (Rey et al., 2003). El nivel de α y γ -tocoferoles en diferentes tejidos porcinos se correlaciona directamente con el contenido en la dieta (Daza et al., 2005; Rey et al., 2006). Por este motivo, existe una patente para la diferenciación de los cerdos ibéricos en función de la alimentación basada en análisis de estos compuestos (Rey Muñoz y López Bote, 2008).

El problema de este método surge cuando las dietas se suplementan con acetato de α -tocoferol sintetizado químicamente, que posee propiedades antioxidantes semejantes al natural. Este aporte hace que los tejidos alcancen valores similares a los obtenidos cuando la alimentación se lleva a cabo en montanera (Cava et al., 1999; Daza et al., 2005). La determinación de las distintas formas esteroisoméricas podría ser la única solución viable para el uso de esta metodología teniendo presente que la composición en tocoferoles varía según la zona anatómica de muestreo, que existe una variabilidad inherente a la campaña y, que, en el caso de productos curados, el tiempo de curación también afecta a su contenido (Rey et al., 2010).

Rey y López-Bote (2014) establecieron que una mayor presencia del estereoisómero RRR se relacionaba con un mayor consumo de la forma natural de tocoferol y una mayor proporción de las formas S se relacionó con una mayor ingesta de dieta mixta. Así se consiguió clasificar las muestras de grasa con un 90% de acierto en validación tras la determinación del estereoisómero RRR y de los γ – α tocoferoles. En el caso del contenido en γ -tocoferoles es más alto en los animales criados en libertad (Daza et al., 2005) debido a que no existe materia prima que pueda ser incorporada a los piensos y que permita alcanzar las proporciones observadas en montanera, no existiendo tampoco la posibilidad de añadir un análogo industrial.

Estos compuestos además de servir para clasificar la materia prima también tienen un papel muy importante en los procesos de maduración del jamón debido a que son capaces de influir en las reacciones de oxidación de los lípidos de la grasa intramuscular dando lugar a las destacables características sensoriales de los productos curados.

Las relaciones existentes entre la composición de ácidos grasos, tocoferoles y neofitadieno para los diferentes sistemas de crianza también han sido estudiadas. Pérez-Palacios et al. (2009) determinaron que la proporción de ácido araquidónico (C20:4 n-6) y linolénico (C18:3 n-3) de la fracción lipídica de grasa intramuscular y subcutánea junto con el contenido de neofitadieno y γ -tocoferol pueden utilizarse para clasificar correctamente los animales en función de la alimentación. Tejeda et al. (2020) sin embargo, concluyeron que es imposible determinar una correlación entre estos compuestos (ácidos grasos, tocoferoles y neofitadieno) debido a la gran heterogeneidad de los sistemas extensivos, dadas las variaciones entre años y zonas geográficas.

Jurado et al. (2013) llevaron a cabo la caracterización y cuantificación de esteroides de la grasa subcutánea de cerdo con el fin de autenticar los sistemas de alimentación, consiguiendo tasas de acierto global en torno al 90%.

3.2.4. Análisis de isótopos de carbono ($\delta^{13}\text{C}$)

El término isótopo se define como el conjunto de átomos de un mismo elemento que se diferencian en su número de neutrones y por lo tanto también en la masa atómica. Cada elemento químico tiene una concentración de isótopos estables característica o natural, pudiéndolos encontrar en forma de isótopos estables, inestables o radiactivos.

Los isótopos estables con mayor aplicación por su gran importancia biológica son: hidrógeno, carbono, nitrógeno, oxígeno y azufre. Cada uno de ellos tiene diferentes aplicabilidades debido a la diferente selectividad que presentan, dependiendo de las rutas metabólicas en las que estén

implicados. Todos ellos permiten la determinación de sus relaciones isotópicas mediante espectrometría de masas por su elevada abundancia.

Para cada isótopo existe una abundancia natural que hace referencia a la distribución de los distintos isótopos estables de los elementos en la naturaleza (Tabla 2).

Tabla 2: Abundancia relativa de los isótopos ligeros más abundantes.
(Fuente: Böcker et al., 2009)

Elemento	Isótopo	Abundancia (%)	Observaciones	Relación de medida
Hidrógeno	¹ H	99,985		D/H
	D	0,015		
	³ H	10 ⁻¹⁴ a 10 ⁻¹⁶	Radiactivo	
Carbono	¹² C	98,89		¹³ C/ ¹² C
	¹³ C	1,11		
	¹⁴ C	10 ⁻¹⁰	Radiactivo	
Nitrógeno	¹⁴ N	99,63		¹⁵ N/ ¹⁴ N
	¹⁵ N	0,367		
Oxígeno	¹⁶ O	99,756		¹⁸ O/ ¹⁶ O
	¹⁷ O	0,039	No utilizado	
	¹⁸ O	0,205		
Azufre	³² S	95,02		³⁴ S/ ³² S
	³³ S	0,75	No utilizado	
	³⁴ S	4,21		
	³⁶ S	0,02	No utilizado	

Existen dos metodologías analíticas para el análisis isotópico:

1. El análisis isotópico de elementos ligeros en forma de gases, que se realiza mediante un grupo de técnicas genéricamente denominados "GIRMS" (Gas Isotope Ratio Mass Spectrometry) o Espectrometría de Masas para la medida de Relaciones Isotópicas en muestras gaseosas. Dentro de esta metodología encontramos diferentes técnicas en función de la precisión requerida y el tamaño de la muestra:
 - La Espectrometría de Masas para la medida de relaciones isotópicas de isótopos estables, o "SIRMS" (Stable Isotope Ratio MS).
 - Las técnicas dedicadas a la medida de las relaciones isotópicas en gases nobles, "NGMS" (Noble Gas MS).

Las técnicas SIRMS se utilizan para el análisis de isótopos estables de H, C, N, O y S en diferentes tipos de muestras. En algunos casos los isótopos a analizar ya forman parte

de moléculas mono o diatómicas y en otros el elemento de interés está formando parte de una molécula o matriz más compleja por lo que es necesario emplear sistemas de preparación de muestras especiales que permitan disponer de elementos de interés en forma de gas (CO_2), antes de llevar a cabo el análisis.

- El análisis isotópico de elementos pesados (B, Ca, Fe, Sr, Nd, U, Th) se analiza por "TIMS" (Thermal Ionisation MS) o espectrometría de Masas de Ionización Térmica.

Para el análisis del isótopo de carbono 13 (^{13}C) se procede a una primera combustión de la muestra en un horno eléctrico donde la materia orgánica se convierte en CO_2 , H_2O y otros gases. Posteriormente se elimina el vapor de agua y otros gases presentes (como óxidos de nitrógeno y óxidos de azufre) mediante una línea de vacío hasta obtener un gas puro de CO_2 . Una vez purificado el CO_2 se lleva a cabo la medida de la relación isotópica $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ tal y como se muestra el proceso en el esquema de la figura 9.

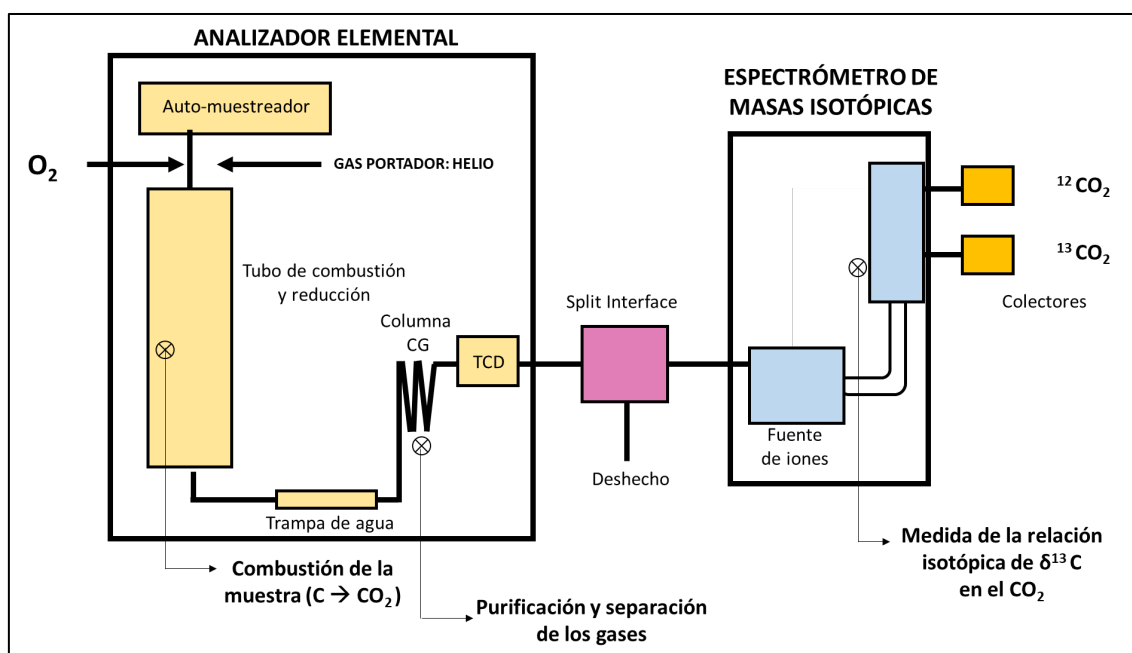


Figura 9: Esquema de trabajo de un Espectrómetro de Masas de Relaciones Isotópicas (IRMS).

Tanto en el laboratorio (de forma artificial) como en la naturaleza se pueden conseguir el enriquecimiento de una molécula a partir de los isótopos constitutivos. Este efecto se conoce como fraccionamiento isotópico y tiene lugar por las diferentes propiedades termodinámicas que presentan los isótopos dependientes de sus masas. En algunas ocasiones, los fraccionamientos isotópicos pueden ser producidos a través del metabolismo de organismos vivos a través de la cadena alimentaria, por esta razón los tejidos animales reflejan la composición isotópica de los alimentos ingeridos.

La determinación de los isótopos estables de carbono se limita a ^{12}C y ^{13}C al tener los valores de abundancia media más altos (Tabla 2). La variación natural en ^{13}C de una muestra se expresa como $\delta^{13}\text{C}$ (‰), definida como:

$$\delta^{13}\text{C en } \text{‰} = \left[\frac{(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{muestra}}}{(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{patrón}}} - 1 \right] * 1000$$

donde $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ es la relación entre el número de ^{13}C y el número de átomos de ^{12}C en la muestra o en el patrón. El patrón que se utiliza internacionalmente es PDB (Pee Dee Belemnite), fósil de belemnita americana de la formación geológica de Pee Dee de Carolina del Sur.

En la presente tesis, se ha llevado a cabo el análisis de los isótopos de carbono con la finalidad de autenticar el régimen de alimentación de cerdos ibéricos, ya que la composición isotópica de los alimentos va a quedar reflejada en la grasa subcutánea (Recio, 2010). La composición isotópica de las plantas va a depender del entorno en el que se han desarrollado y de su fisiología, pudiendo ser distinta según las condiciones agroclimáticas de las zonas de producción u otros factores relacionados.

Las plantas continentales utilizan el CO_2 presente en la atmósfera para formar compuestos orgánicos. Los valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) del CO_2 atmosférico son esencialmente constantes y se sitúan en torno al -7‰, como resultado de procesos de homogeneización y mezcla en la troposfera. Por tanto, la composición isotópica de una planta va a depender del mecanismo fotosintético que utilice, teniendo en cuenta que se va a producir un fraccionamiento hacia isótopos más ligeros porque las plantas utilizan preferentemente ^{12}C durante la fotosíntesis.

En la figura 10 se presenta la distribución bimodal que encontramos en la naturaleza en función de los dos modelos fotosintéticos fundamentales: el ciclo de Calvin (C_3) y el Ciclo de Hatch y Slack (C_4).

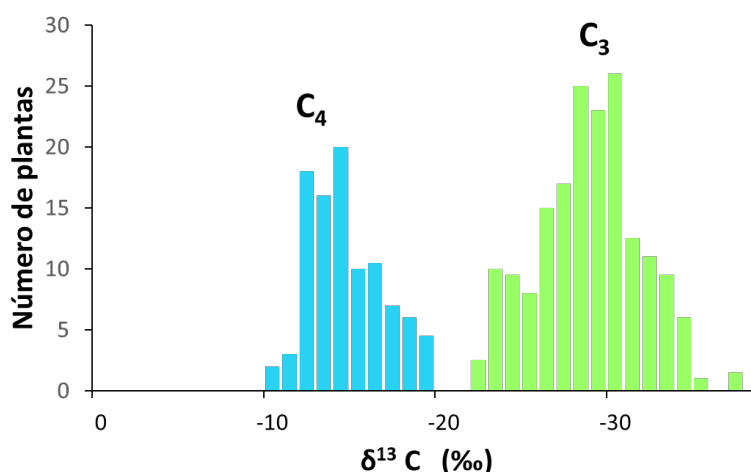


Figura 10: Histograma de la proporción de isótopos de Carbono de plantas C_3 y C_4 . (Fuente: adaptado de Cerling et al., 1997).

El ciclo de las plantas C_3 es más largo y por ello el fraccionamiento isotópico es más pronunciado que el caso de plantas C_4 que siguen un ciclo fotosintético más corto. En el caso de los organismos heterótrofos, estos en general tienen composiciones isotópicas $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ que se corresponden con las relaciones isotópicas de su régimen de alimentación. Por ello, es posible la reconstrucción de dietas pasadas o presentes por los valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) de tejidos de

animales herbívoros u omnívoros con diferentes resoluciones temporales en función de su determinación en diferentes tejidos:

1. La determinación de los valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) en el colágeno de los huesos va a proporcionar información sobre los periodos iniciales o sobre la totalidad del ciclo vital del animal.
2. La determinación de los valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) en los tejidos blandos refleja tiempos más recientes, estando influidos los valores por el tiempo medio de reemplazamiento del carbono en cada tejido.
3. La determinación de los valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) en las heces son indicadores de la dieta inmediata.

Las diferencias en el valor de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) en distintos tejidos se deben al diferente tiempo de recambio del carbono que se va a dar en todas las sustancias del cuerpo, ya sean metabolitos orgánicos o inorgánicos (Kennedy y Krouse, 1990). Para medir el recambio generado con el cambio de la dieta se llevan a cabo dietas con diferentes firmas isotópicas observándose la alteración en la composición isotópica. Esta alteración dependerá de la velocidad con la que se vayan incorporando los nuevos constituyentes (Gannes et al., 1998). La elección del tejido resulta particularmente importante ya que existen tejidos metabólicamente activos en el organismo con recambios más rápidos (hígado, musculo o sangre) y tejidos con menor actividad de reemplazo (colágeno y el hueso) (Hobson y Clark, 1992).

En el caso del cerdo, las dietas más comunes se basan en la bellota, que es una planta C_3 y pienso cuyo ingrediente principal es el maíz que es una planta C_4 . Así, el análisis de isótopos estables en el sector del cerdo se ha utilizado para caracterizar la alimentación recibida por el cerdo durante el cebo (González-Martín et al., 1999; Recio et al., 2013) y para diferenciar la raza (González-Martín et al., 2001). Las determinaciones han sido variadas llevándose a cabo en muestras de tejido adiposo (tocino), tejido hepático o músculo (Delgado Huertas et al., 2007; González-Martín et al., 1999; González-Martín et al., 2001; Nieto y Aguilera, 2009; Recio et al., 2013).

Los primeros estudios publicados con esta metodología en tejidos del animal para la identificación de la dieta surgieron a finales del siglo XX. González-Martín et al. (1999) llevaron a cabo un estudio en el que relacionaban la abundancia de ^{13}C en tejido adiposo, muscular y hepático con tres tipos de dieta diferente (bellota, pienso y combinación de ambas). Los resultados permitieron concluir que el tejido idóneo para realizar las comparaciones era el tejido adiposo. Este tejido era el que mejor reflejaba las diferencias de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) de forma que fue posible establecer una regresión lineal entre la riqueza en ^{13}C y las arrobas de bellota recibidas (Figura 11).

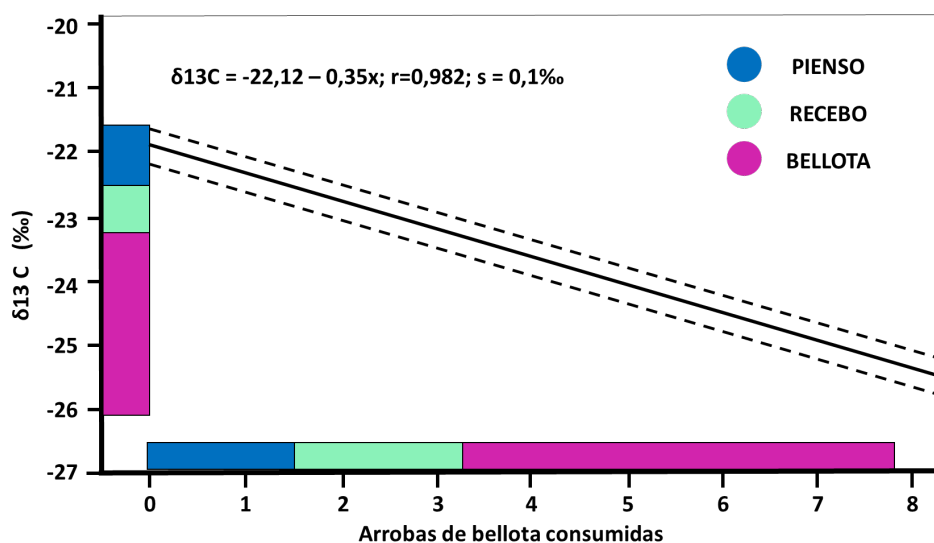


Figura 11: Cuantificación de las arrobas de bellota recibidas por los cerdos a partir del análisis del isótopo $\delta^{13}C$ (‰). (Fuente: González-Martín et al., 1997).

El estudio de los isótopos estables de carbono y de azufre en tejido hepático también fueron utilizados para la identificación de la raza ibérica (bellota y pienso) frente a la raza blanca (pienso) (González-Martín et al., 2001). Usando la relación isotópica $^{13}C/^{12}C$ ($\delta^{13}C$ (‰)) fue posible diferenciar entre animales ibéricos de bellota y animales de raza blanca, pero no fue posible discriminar entre razas con la misma alimentación. Sin embargo, la combinación de los resultados de $\delta^{13}C$ y $\delta^{34}S$ si permitió obtener una diferenciación correcta en función de las razas.

Delgado Huertas et al. (2007) determinaron el valor isotópico de $\delta^{15}N$ en lomo de cerdo con el fin de identificar el régimen de alimentación de los animales. Obtuvieron diferentes rangos para el valor de $\delta^{15}N$ que les permitieron clasificar las canales en función de la alimentación en la fase de engorde, con niveles de $\delta^{15}N < 5$ para la alimentación de bellota y $\delta^{15}N > 5$ para la alimentación a base de pienso convencional o alto oleico.

Nieto y Aguilera (2009) llevaron a cabo el análisis isotópico $\delta^{13}C$ y $\delta^{15}N$ en paleta y lomo de cerdos sometidos a tres tipos de alimentación: bellota, recebo y pienso. Los resultados mostraron mayores concentraciones de $\delta^{13}C$ y menores de $\delta^{15}N$ para la alimentación de bellota con diferencias significativas para el tipo de alimentación. En cuanto a la zona de muestreo únicamente se encontraron diferencias significativas para el $\delta^{15}N$.

Recio et al. (2013) aplicó el análisis isotópico $\delta^{13}C$ a ésteres metílicos de los ácidos grasos de grasa porcina de diferentes tipos de alimentación. En este caso el análisis se llevó a cabo en un cromatógrafo de gases al que se acopló un espectrómetro de masas de flujo continuo. La cuantificación de $\delta^{13}C$ se obtuvo para cada uno de los ésteres metílicos que han sido separados anteriormente por cromatografía capilar. Los resultados concluyeron que se precisa de la cuantificación de las abundancias isotópicas de los cuatro ácidos grasos principales (oleico, esteárico, palmítico y linoleico) para discriminar con claridad la alimentación. Las mayores dificultades para la discriminación entre una alimentación de pienso, bellota y recebo se

encontraron en el recebo debido a la mayor variabilidad de los ingredientes que la integran la dieta.

Blaitt et al. (2021) han estudiado los tiempos de remplazo de $\delta^{13}\text{C}$ a medida que se iba modificando la dieta C_4 (a base de maíz) con alimentación basada en plantas C_3 (a base de arroz). Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto que la costilla del cerdo fue mejor que la pezuña para el proceso de trazabilidad, ya que reflejaba los cambios sufridos en la dieta del animal durante un periodo de tiempo más largo.

Aunque las técnicas de determinación isotópica ofrecen resultados prometedores su principal inconveniente que presenta es el alto coste de instrumentación y el elevado precio por muestra analizada.

3.3. Determinación de compuestos volátiles

3.3.1. Análisis de compuestos volátiles

El análisis del perfil de volátiles de la grasa de canales también ha sido utilizado para determinar la dieta recibida por el cerdo ibérico (Narváez-Rivas et al., 2011). Esta técnica se ha enfocado principalmente al análisis de piezas nobles, tanto durante el proceso de curación como en el producto final, con el objetivo de clasificarlas en función del sistema en crianza del cerdo (Carrapiso et al., 2003; Muriel, Antequera, et al., 2004; Narváez-Rivas et al., 2010; Sánchez del Pulgar et al., 2013; Timón et al., 2002) y de la raza (Carrapiso et al., 2003; García-González et al., 2013).

Según describe Narváez-Rivas et al. (2011) el perfil de volátiles se puede llevar a cabo por diversas técnicas analíticas siendo la empleada para este tipo de muestras la técnica de Cromatografía de Gases de purga y trampa acoplado a la Espectrometría de Masas (GC-MS). En este caso, una vez obtenidos los compuestos volátiles se utilizaron como descriptores para diferenciar las dietas de montanera, cebo de campo y cebo intensivo. Se precisó de técnicas de análisis discriminante para generar los modelos de clasificación, para los que obtuvo el 100% de clasificación correcta mediante la cuantificación de 11 compuestos volátiles.

Las técnicas de determinación de volátiles mediante GC-MS son muy precisas y eficaces, sin embargo, su principal inconveniente es que requieren mucho tiempo y son difíciles de implementar en prácticas de control rutinario de las muestras de carne o grasa (Alonso et al., 2008).

3.3.2. Análisis mediante olfatometría electrónica

En la industria alimentaria cada vez son más los estudios que aplican olfatometría electrónica, también conocida como nariz electrónica o nariz artificial. El fundamento de la técnica se basa en generar un perfil de volátiles simplificado mediante un conjunto de sensores de gases que emiten una respuesta electrónica cuando reconocen patrones de determinados olores, simples o complejos (Li et al., 2018). Para ello es necesario una serie de muestras de aprendizaje y calibración de los modelos predictivos a través de tratamientos quimiométricos de las respuestas obtenidas. La finalidad es poder cuantificar la presencia de compuestos mediante

estimaciones. La metodología precisa de una optimización del proceso con estandarización de las condiciones. Se trata de una técnica más rápida y barata que el análisis de compuestos volátiles mediante GC-MS, de fácil manejo, bajo coste y rapidez para la obtención de los resultados y que permite tomar decisiones rutinarias con la posibilidad de trabajar en campo (Wilson, 2017).

Los primeros estudios en el sector del cerdo ibérico surgieron con la investigación de González-Martín et al. (2000) con el objetivo de diferenciar el régimen alimenticio a partir de muestras de grasa subcutánea. En ese estudio se obtuvieron clasificaciones correctas del 72-96% en predicción, resultados que se consideraron aceptables para clasificar los animales de categoría de cebo, de recebo y bellota. Estudios más recientes han empleado métodos de clasificación más complejos como Redes Neuronales Artificiales (ANN) y algoritmos fuzzy Artmap para el tratamiento de las señales de la nariz electrónica y clasificar en función del régimen de alimentación, el tiempo de maduración de los productos finales y conseguir la diferenciación entre productores (Llobet et al., 2007; Santos et al., 2004).

3.3.3. Espectrometría de movilidad iónica

La técnica de espectrometría de movilidad iónica (Ion Mobility Spectrometry; IMS) se usa para la caracterización y separación de sustancias químicas ionizables y volátiles. El principio físico se basa en la distinta movilidad de los iones moleculares, en función del tamaño y la forma, en un medio formado por un gas neutro y bajo la influencia de un campo eléctrico a presión atmosférica.

Es una técnica que tuvo origen en los años 50 pero hasta la década de los 90 no aparecieron los primeros espectrómetros de movilidad iónica, en los cuales la muestra entra en estado gaseoso y posteriormente se ioniza. Los iones formados pasan a través de una rendija de entrada al tubo de deriva en el cual se lleva a cabo la separación de los iones bajo la aplicación de un campo eléctrico, para ser finalmente detectados por un colector de iones (placa de Faraday) (Eiceman y Karpas, 2005). El inconveniente que tiene la tecnología es el empleo de fuentes radioactivas como el níquel 63, tritio y americio 241.

La tecnología IMS tiene la ventaja de ser fácilmente miniaturizada para operaciones de campo mostrando ser una herramienta muy rápida, sensible y económica para el análisis y la caracterización eficiente a través de los compuestos volátiles en muestras de diversas naturalezas (Baumbach et al., 2003; Bota y Harrington, 2006; Keller et al., 1998; Vautz et al., 2006).

La IMS se puede combinar con otras técnicas como GC y MS ampliando su campo de aplicación desde la detección de armas químicas y biológicas hasta la seguridad ambiental, el diagnóstico médico y la industria farmacéutica (Armenta et al., 2011; Baumbach y Westhoff, 2006). En relación con el campo de la presente tesis, se aplica en el control de procesos y de calidad en la industria alimentaria (Vautz et al., 2006). En este caso, una posible configuración es el acoplamiento de un espectrómetro de movilidad iónica junto con un cromatógrafo de gases lo cual permite introducir dentro del tubo de deriva la muestra previamente fraccionada mediante

una columna cromatográfica capilar (Kanu y Hill, 2008). La combinación de ambas técnicas es sencilla y efectiva ya que la columna y el tubo de deriva operan a presión ambiente introduciendo la muestra de forma gaseosa. Esta combinación de técnicas tiene ventajas al facilitar el análisis de movilidad iónica de matrices complejas de distinta naturaleza y presentar la capacidad de análisis de un alto número de muestras en corto tiempo. El método de análisis no precisa preparación de la muestra o esta es mínima y aporta resultados cualitativos que pueden llegar a ser cuantificables.

En la figura 12 podemos observar los principales componentes y el funcionamiento de un detector IMS conectado con un cromatógrafo de gases capilar unidimensional.

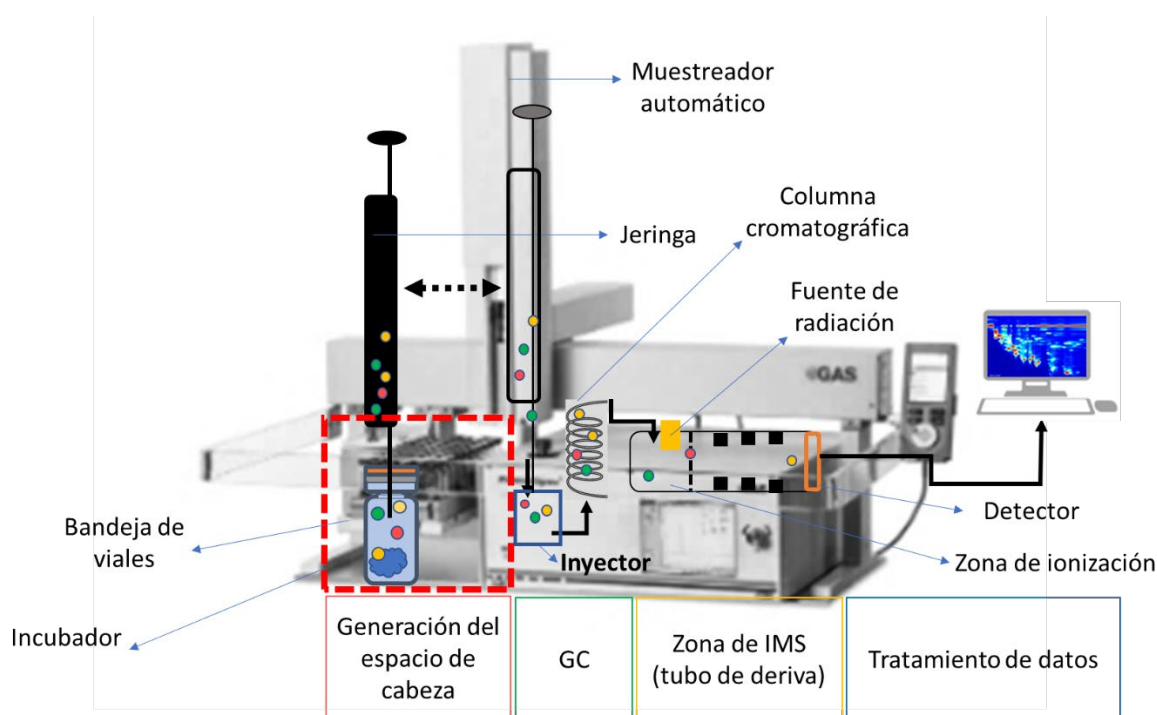


Figura 12: Esquema del equipo GC-IMS empleado en el presente estudio.

Esta metodología implica en un primer paso la vaporización de la mezcla y su división en componentes individuales mediante una columna cromatográfica capilar. En la región de la reacción es donde se forman los iones reactivos que forman monómeros protonados y a veces dímeros para posteriormente ser inyectados en el tubo de deriva. Estos iones avanzan a una velocidad constante hacia el detector separándose en función de sus secciones transversales de carga, masa y colisión. Finalmente se generan cromatogramas mediante un software especializado en tres dimensiones (Figura 13) donde en el eje "x" se muestran los diferentes tiempos de vuelos (drift time) detectados para los compuestos analizados, en el eje "y" se muestran los tiempos de retención en la separación cromatográfica, mientras que en el eje "z" se muestra la altura de la señal en una escala de colores donde el color azul marino indica la señal de fondo y el color rojo la máxima intensidad de la señal.

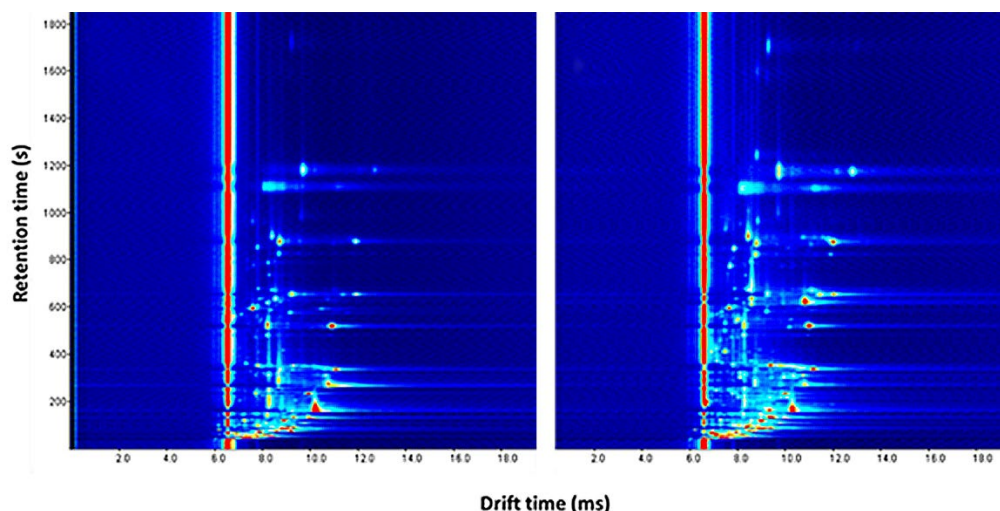


Figura 13: Espectros GC-IMS.

Como se mencionó anteriormente esta técnica tiene un amplio campo de aplicabilidad en el sector agroalimentario. Las primeras investigaciones datan de los años noventa para el cálculo de bacterias en comidas procesadas y crudas (Ogden y Strachan, 1993; Strachan y Ogden, 1993) y para la cuantificación de etanol en la cerveza durante el proceso fermentativo de las levaduras (Kotiaho et al., 1995). A partir del año 2000 tuvieron lugar las primeras aplicaciones en el sector cárnico para la determinación de aminas biogénicas causadas por degradaciones durante el proceso de almacenamiento (Bota y Harrington, 2006; Karpas et al., 2002).

Alonso et al. (2008) propuso el primer método destinado al control de fraudes en el sector del cerdo ibérico mediante esta técnica. El método se basaba en la determinación precisa de los compuestos volátiles en muestras de grasa subcutánea con el fin de identificar el régimen de alimentación en los cerdos de raza ibérica. La herramienta presenta capacidades de discriminación incluso de las grasas procedentes de animales que han recibido una alimentación suplementada imitando el perfil de ácidos grasos de la montanera. Esto apunta a que podría ser una técnica analítica aplicada en la detección de posibles intentos de fraude.

Las posteriores investigaciones que han aplicado esta técnica analítica han ido orientadas a la autenticación de piezas de jamón en función de la alimentación y el genotipo con resultados muy prometedores (>90% de aciertos) (Arroyo-Manzanares et al., 2018). Los estudios más recientes se han centrado en el diseño de muestreos no destructivos en las piezas de jamón, la optimización de la metodología de trabajo, y en la interpretación quimiométrica de los resultados (Arroyo-Manzanares et al., 2018; Martín-Gómez et al., 2019, 2022). Martín-Gómez et al. (2019) han propuesto un muestreo que sustituye la tradicional cala de hueso por una aguja veterinaria desechable que se impregna de grasa en la zona de la punta del jamón para posterior análisis de los compuestos volátiles mediante GC-IMS. El conjunto de datos espectrales por muestra, junto con el uso de las adecuadas herramientas quimiométricas permite construir una ecuación de calibración para la posterior clasificación de piezas en función de las categorías del jamón. Los resultados obtenidos fueron del 100% de muestras correctamente clasificadas en el caso de la raza y del 91,7% para el régimen de alimentación. Finalmente, Rodríguez-Hernández et al. (2022) han aplicado la tecnología GC-IMS para la diferenciación in vivo de los regímenes

de alimentación del cerdo ibérico mediante el volatiloma fecal. Obtuvieron porcentajes del 92,3% y del 96,2% de acierto para la clasificación de alimentación de bellota frente a alimentación con pienso con dos tratamientos diferentes de la señal espectral. El estudio se presenta como una primera aproximación a la autenticación en el animal vivo mediante técnicas no invasivas y respetuosas con el bienestar animal.

Esta técnica tiene la ventaja de trabajar con huellas espectrales de cientos de compuestos químicos con presencia o concentración determinada en cada régimen alimenticio. Esto permite caracterizar el producto siendo, además, imposible manipular las concentraciones de los compuestos mediante estrategias alimenticias. Otras de sus ventajas es el bajo coste por análisis en comparación con otras metodologías, así como la posibilidad de implementarlo en laboratorios agroalimentarios al ser portátil y trabajar a temperatura ambiente y presión atmosférica. Por todas estas razones la GC-IMS puede plantearse como una herramienta factible para la mejora de los actuales procedimientos de autenticación de los productos del cerdo ibérico en las diferentes etapas del proceso productivo: granja, matadero y punto de venta. Sin embargo, es necesario llevar a cabo investigaciones más robustas que permitan obtener resultados consistentes y estandarizar la metodología como un análisis de rutina.

3.4. Técnicas no destructivas y/o en línea

3.4.1. Análisis por ultrasonidos

La determinación de la calidad de canales a través de ultrasonidos se basa en la diferente velocidad de las ondas en función de la composición de la grasa. Es considerada una metodología no destructiva y económica para poder llevar controles en línea gracias a la portabilidad de los equipos. El principal inconveniente a la hora de aplicar esta herramienta es la temperatura en el momento de tomar las medidas (Niñoles et al., 2007).

El análisis de ultrasonidos se empleó por primera vez en la industria cárnica a mediados del siglo XX como técnica no destructiva para la medición de la grasa y el músculo de animales vivos de diferentes especies (Hedrick, 1983; Houghton y Turlington, 1992). Son diversos los estudios llevados a cabo con esta tecnología que han demostrado que puede ser útil para evaluar el peso en vivo al sacrificio sobre el espesor de la grasa y el porcentaje magro (McLaren et al., 1989) y para estimar el grosor de grasa dorsal en la canal, así como el contenido de grasa intramuscular en carne (Ayuso et al., 2014, 2018; Daza, López-Bote, et al., 2006; Mörlein et al., 2005; Newcom et al., 2005). De este modo se podría evaluar a los animales vivos de forma independientes para ser destinados a la reproducción llevando a cabo una selección genética o bien tomar decisiones comerciales previas al sacrificio. En concreto para la raza porcina ibérica se ha demostrado que la tecnología basada en ultrasonidos es capaz de predecir los rendimientos de la canal y de los cortes comerciales a tiempo real (Ayuso et al., 2013; Daza, Mateos, et al., 2006), además de diferenciar los sistemas de alimentación regulados en la norma del cerdo ibérico (montanera, recebo y cebo) y el uso de piensos concentrados (alto oleico) (Ayuso et al., 2014; Niñoles et al., 2007, 2011). Niñoles et al. (2007) también planteó su utilización para la diferenciación de genotipo encontrando diferencias significativas entre los lotes de raza ibérica pura y los lotes de cerdos mestizos Ibéricos x Duroc.

El análisis por ultrasonidos también ha sido aplicado para la evaluación y caracterización de la duración de la montanera, para ello se han tomado en consideración el espesor de la grasa dorsal, el tamaño de los adipocitos y la correlación con la infiltración de la grasa muscular, concluyéndose que resulta ser un buen indicador (Ayuso et al., 2018).

3.4.2. Análisis de imágenes

Existe una gran variabilidad en los estudios que aplican el análisis de imágenes relacionados con el sector ibérico. Petró et al. (2003) emplearon las imágenes en blanco y negro de loncha de jamón (crudo y curado) mediante sistemas de visión artificial para la clasificación en función del sistema productivo. El análisis multifractal con imágenes RGB de alta resolución ha sido empleado para la caracterización de la infiltración de la grasa y la predicción de calidad en productos derivados del cerdo ibérico (Perán-Sánchez et al., 2020; S. Serrano et al., 2013, 2019). Otras técnicas relacionadas con el análisis de imágenes como la Resonancia Magnética (RM) (Cernadas et al., 2005; Pérez-Palacios et al., 2010) e imágenes hiperespectrales NIR han sido utilizadas para la caracterización de parámetros de calidad en lonchas de jamón ibérico (Garrido-Novell et al., 2015).

La RM destaca por ser una técnica no destructiva, no invasiva, no ionizante e inocua, se emplea de forma complementaria y/o alternativa a los métodos clásicos para la determinación de características en la muestra. Hoy en día se encuentran en fase de investigación y desarrollo para su implementación en el análisis de rutina del sector. Hasta el momento ha sido empleada en la caracterización de productos curados mediante el desarrollo de nuevos algoritmos de análisis de imágenes y la aplicación de técnicas de minería de datos, en función del músculo y de la etapa de curación (Ávila et al., 2007; Caballero et al., 2016; Cernadas et al., 2005; Pérez-Palacios et al., 2017). Son pocos los estudios que se han llevado a cabo, mediante RM, con el fin de diferenciar los distintos regímenes de alimentación y/o los distintos genotipos en cerdo ibérico. Pérez-Palacios et al. (2010) obtuvieron una clasificación satisfactoria según la alimentación, montanera frente a pienso alto oleico, utilizando las diferencias observadas en las características texturales computacionales mediante un análisis de Resonancia Magnética de Imagen (RMI) en el músculo *Biceps femoris*. Cernadas et al. (2001) mediante el procesamiento de imágenes de resonancia magnética aplicada en lomo de cerdo ibérico concluyeron que la metodología también tenía potencial para clasificar en función del genotipo.

4. ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO

La espectroscopía es la ciencia que se encarga del estudio de la interacción entre la radiación electromagnética y la materia, proporcionando información de la sustancia en relación con su estructura molecular.

La región de espectroscopía del infrarrojo cercano fue descubierta en el año 1800 por Herschel al examinar la radiación infrarroja a través de la medida de temperatura de los colores creados por el paso de la luz solar a través de un prisma (Herschel, 1800). Sin embargo, no se desarrolló tecnológicamente ni instrumentalmente hasta los años sesenta por el grupo de investigación de Karl Norris en el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA, United State Department of Agriculture) tras la utilización de la espectroscopía NIR para el estudio de muestras complejas de origen vegetal (Ben-Gera y Norris, 1968; Birth y Norris, 1958). Los avances en la óptica y en el campo de la electrónica posibilitaron el desarrollo de nuevos instrumentos que permitirían el registro de espectros completos con mayor rapidez y reproducibilidad (Henry, 1999; Noble, 1995). Al mismo tiempo tuvo lugar el desarrollo de softwares informáticos que permitían mayor capacidad de cálculo siendo capaces de almacenar y tratar la información espectral para extraer la información analítica relevante mediante técnicas quimiométricas.

A partir de este momento aumentó el interés por la espectroscopía infrarroja convirtiéndose en una técnica ampliamente utilizada debido a su aplicabilidad en diferentes campos. Es una herramienta versátil que permite la identificación, caracterización y cuantificación de múltiples compuestos en agricultura y en otras industrias como la polimérica, farmacéutica y petroquímica (Chang et al., 2001).

4.1. Fundamentos de la espectroscopía infrarroja

La región del infrarrojo está formada por un amplio intervalo del espectro electromagnético dividida en tres regiones: la región del infrarrojo cercano (NIR; Near InfraRed), la región del infrarrojo medio (MIR; Middle InfraRed) y la región del infrarrojo lejano (FIR; Far InfraRed) (Burns y Ciurczak, 1992).

La región en la que se centra el presente trabajo es la del NIR está situada entre la radiación MIR y la Visible (Figura 14) y ubicada en la región espectral comprendida entre los 780 a los 2.500 nm, si se expresa como longitudes de onda, o de 12.900 cm^{-1} a 4.000 cm^{-1} , si se expresa según el número de onda (Næs et al., 2002; Osborne et al., 1993; Shenk y Westerhaus, 1995).

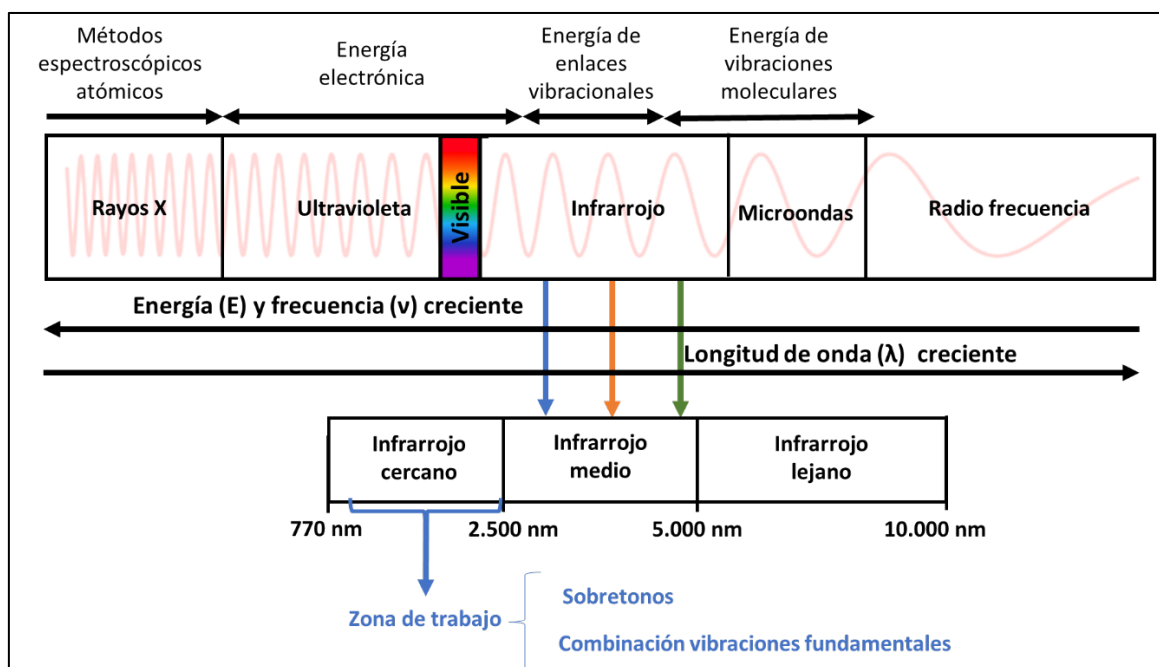


Figura 14: Regiones del espectro electromagnético.

La tecnología NIRS como técnica espectroscópica se fundamenta en la interacción que tiene lugar entre la radiación electromagnética infrarroja y la muestra, siendo posible trabajar en cualquiera de los estados físicos en los que se encuentre la muestra (gaseoso, sólido o líquido).

El fenómeno espectroscópico que provoca la absorción de energía por la materia para cada una de las regiones se debe a las rotaciones moleculares en el caso del FIR, a las vibraciones moleculares fundamentales en el caso del MIR y a los sobretonos y bandas de combinación de las vibraciones moleculares fundamentales en el caso del NIR (Goddu y Delker, 1960; Workman, 1999).

Para que se produzca el fenómeno de absorción y se refleje en la señal emitida denominado espectro de absorción, la energía del fotón incidente debe producir el acoplamiento radiación-materia en el cual la molécula absorbente experimenta un cambio neto en el momento dipolar debido a su movimiento de vibración o rotación. Cuando esto ocurre el campo eléctrico asociado a la radiación puede interactuar con el campo eléctrico originado por la fluctuación del momento dipolar de la molécula.

Los modos de vibración moleculares más importantes (Figura 15) son las vibraciones de tensión o estiramiento (*stretching*), tanto simétricas como asimétricas, y las vibraciones de flexión (*bending*) ocasionados en el mismo plano (tijereteo o balanceo) o fuera de plano (aleteo o torsión).

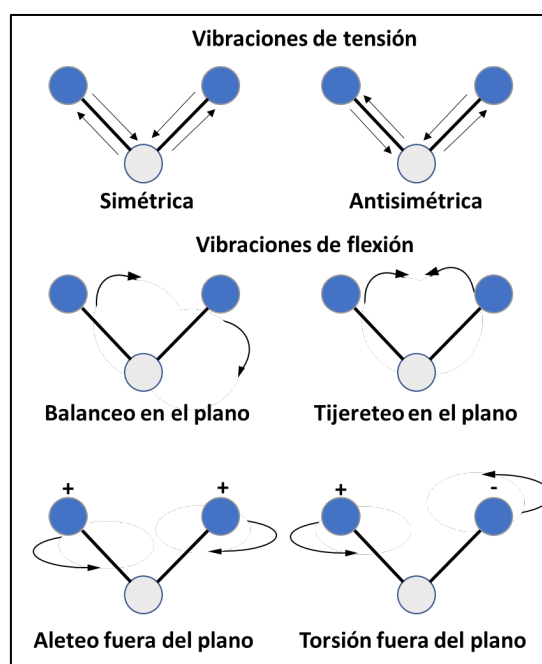


Figura 15: Modos de vibración molecular en la región NIR (Fuente: Adaptado de Osborne y Fearn, 1986).

Para que la energía del fotón pueda ser absorbida por las moléculas es necesario que la frecuencia de radiación iguale a la frecuencia de vibración natural de la molécula desencadenando una transferencia neta de energía que da lugar a un cambio en la amplitud de la vibración molecular (Skoog et al., 2001).

La interacción de la radiación electromagnética y la materia provoca una variación de la energía de la molécula (ΔE_m) en una cantidad discreta, exactamente equivalente a la energía del fotón, y que se ve incrementada a partir de los diferentes modos de vibración molecular a través de tres mecanismos diferentes (Burns y Ciurczak, 1992; Næs et al., 2002; Osborne et al., 1993).

- Sobretonos o armónicos de las vibraciones fundamentales existentes en la región del infrarrojo medio, los cuales son múltiplos aproximados de las vibraciones fundamentales.
- Combinación de dos o más vibraciones fundamentales del infrarrojo medio.
- Absorciones electrónicas debidas al movimiento de electrones entre los diferentes niveles energéticos.

De esta forma se ve alterada la Energía molecular Total (E_mT) de la molécula que se define como el sumatorio de las energías de los diferentes niveles energéticos posibles correspondientes a transiciones de niveles de energía en los que están implicados los electrones y las vibraciones, rotaciones y traslaciones de la molécula:

$$E_m T = E \text{ electrónica} + E \text{ vibracional} + E \text{ rotacional} + E \text{ Traslacional}$$

Las moléculas monoatómicas como He, Ne, O₂, N₂ o Cl₂ no absorben en el infrarrojo cercano debido a que el momento dipolar no se altera durante la vibración o rotación. Por lo que la

absorción de radiación infrarroja está limitada a especies moleculares en las cuales existen pequeñas diferencias de energía entre los distintos estados vibracionales y rotacionales debido a que no tiene suficiente energía para producir transiciones electrónicas a lo largo de su longitud de onda. En el caso de las materias sólidas y líquidas la rotación está muy limitada por lo que en este tipo de muestras solo interesan los picos vibracionales.

Para que la molécula absorba radiación infrarroja el fotón debe tener suficiente energía para poder provocar un paso de nivel energético molecular debido a que los niveles están cuantizados (Figura 16).

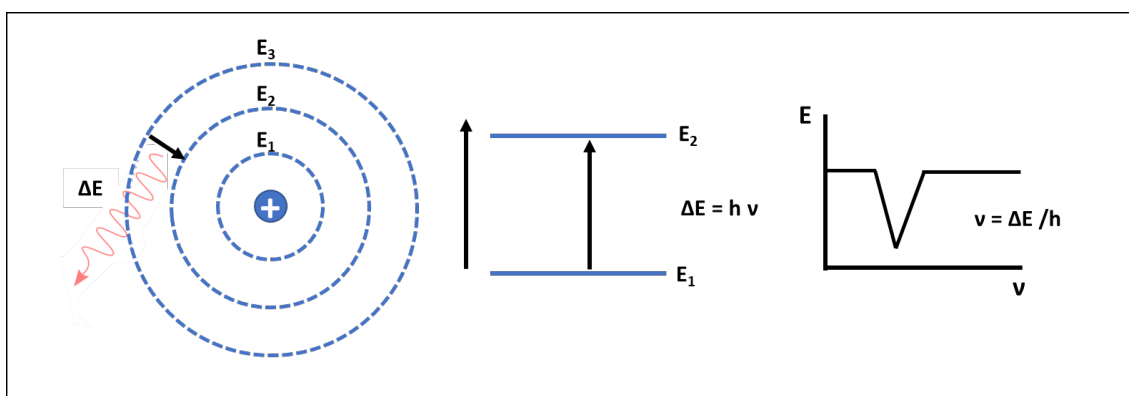


Figura 16: Cuantificación energética molecular (Fuente: Adaptado de Osborne y Fearn 1986)

Así, se puede expresar la variación de la energía (ΔE) entre dos estados al producirse un tránsito energético como:

$$\Delta E = h \cdot \nu$$

Siendo (h) la constante de Planck y (ν) la frecuencia de vibración que viene dada por la siguiente expresión:

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}}$$

Siendo, k una constante de proporcionalidad que depende de las características de los enlaces químicos y μ la masa reducida de los átomos implicados en un determinado enlace, de masas m_1 y m_2 , definida como:

$$\mu = \frac{m_1 m_2}{m_1 + m_2}$$

Según la mecánica cuántica los osciladores no pueden tener cualquier valor de energía potencial, sino los permitidos por la relación:

$$E = \left(\nu + \frac{1}{2} \right) \cdot h \cdot \nu$$

Donde (ν) es el número cuántico vibracional que únicamente puede tomar valores enteros: 0,1,2,3 Sustituyendo según ν quedaría:

$$E = \left(\nu + \frac{1}{2} \right) \cdot \frac{h}{2\pi} \cdot \sqrt{\frac{k}{\mu}}$$

Para cualquier pareja de valores consecutivos a (ν) tendremos que los valores energéticos adyacentes son:

$$\nu = 0 \rightarrow E_0 = \frac{1}{2} \cdot \frac{h}{2\pi} \cdot \sqrt{\frac{k}{\mu}}$$

$$\nu = 1 \rightarrow E_1 = \frac{3}{2} \cdot \frac{h}{2\pi} \cdot \sqrt{\frac{k}{\mu}}$$

Se puede escribir la diferencia energética entre estos niveles como:

$$\Delta E = E_1 - E_0 = \frac{h}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}} = h \cdot \nu$$

Según las reglas de selección, para un oscilador armónico (Figura 17-a) las únicas transiciones que pueden tener lugar son aquellas en el que el número cuántico vibracional cambie en una unidad, $\Delta\nu = \pm 1$. Al estar los niveles vibracionales equiespaciados, la vibración molecular dada por una radiación en una determinada longitud de onda se va a observar como un pico de absorción.

Sin embargo, la vibración de los enlaces covalentes en una molécula real no sigue un movimiento armónico simple. Cuando dos átomos se aproximan existe una repulsión coulombica entre sus núcleos y en sentido contrario al del movimiento. Esto implica un aumento más rápido en la energía potencial. En el caso de que los átomos se alejen, la distancia interatómica se aproxima a la distancia de la rotura del enlace y por ello se disminuye la energía potencial.

En estos casos los niveles de energía vibracional cuantificados no están igualmente espaciados dentro del pozo de energía potencial, observando similitudes entre los comportamientos osciladores armónicos y no armónico entorno a la posición de equilibrio (Figura 17-b). Este fenómeno se conoce como anarmonía y da como resultado que la frecuencia de los sobretonos es ligeramente menor que los múltiplos de números enteros de la frecuencia fundamental ($\Delta\nu = \pm 1$). El primer sobretono ($\Delta\nu = 2$) es de intensidad mayor que los siguientes.

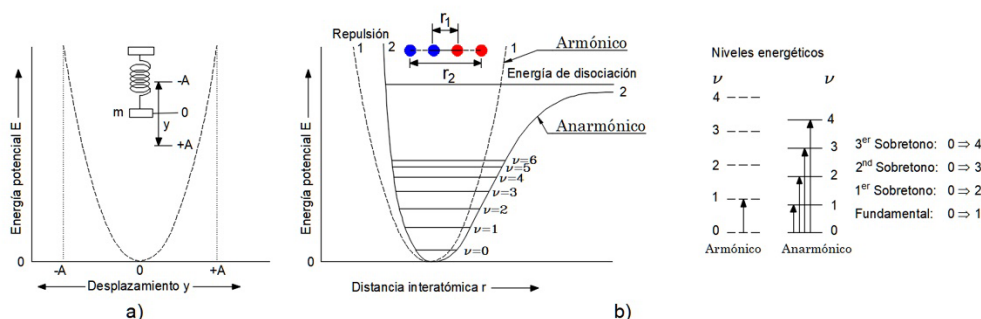


Figura 17: Diagrama de energía potencial y niveles energéticos. Osciladores armónicos e inarmónicos. (Fuente: Hernández Hierro, 2008, Hernández Ramos et al., 2021, Vicente Hinestroza et al., 2014).

En el modelo del oscilador anarmónico la energía viene dada por la siguiente expresión:

$$E = \left(v + \frac{1}{2}\right) h \cdot \nu - \left(v + \frac{1}{2}\right)^2 h \cdot \nu \cdot x - \left(v + \frac{1}{2}\right)^3 h \cdot \nu \cdot x' - \dots$$

Donde (v) es el número cuántico vibracional (0,1,2,3...), (h) la constante de Planck, (ν) la frecuencia de vibración y (x) y (x')... son constantes de anarmonicidad, que tienen valores pequeños positivos y de magnitud decreciente. Puede observarse que en el modelo anarmónico el incremento de (v) genera (ΔE) cada vez más pequeños, por lo que llega momento en el que pueden ser ignorados. Además, se observan las transiciones con (Δv) = $\pm 2, \pm 3, \dots$ cuyas bandas se denominan sobretonos a diferencia de la primera banda fundamental (Δv) = ± 1 .

Las frecuencias de los sobretonos ocurren en la zona comprendida entre 4.000 y 14.300 cm^{-1} (700-2500 nm). Además de los sobretonos, pueden aparecer bandas de combinación y diferencia, si dos o más vibraciones diferentes interactúan para originar bandas con frecuencias que son sumas o diferencias de las fundamentales.

Por ejemplo:

$$(\nu_{comb}) = n_1 \cdot \nu_1 \pm n_2 \cdot \nu_2 \pm \dots$$

Siendo n_1, n_2, \dots números enteros y ν_1, ν_2 las frecuencias de las transiciones que contribuyen a la banda de combinación.

4.2. Interacción materia-radiación

Según se observa en la figura 18 la interacción entre la materia y la radiación incidente puede ser absorbida por la muestra (A) y en algunos casos llega a atravesar la muestra por el lado opuesto del haz de luz lo que se denomina fenómeno de transmisión (D). También puede ser reflejada sin penetrar en la muestra lo que es conocido como reflectancia especular (B) o ser reflejada una vez ha penetrado en la materia lo que se conoce como reflectancia difusa (C). Debido a factores como el tamaño de partícula y el índice de refracción podemos encontrar otros fenómenos en los que se pierde la energía por refracción y por radiación dispersa o scatter al dispersarse la luz en diferentes direcciones (Shenk et al., 1992; Siesler et al., 2002).

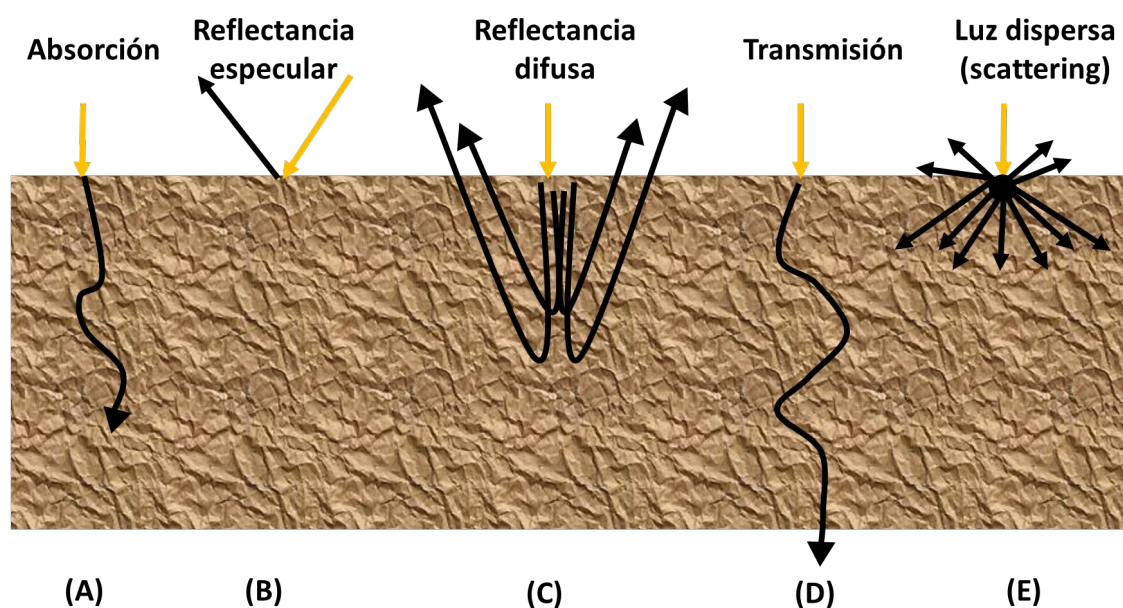


Figura 18: Fenómenos de interacción radiación-materia.

En el modo de transmisión la absorbancia se define como $\log 1/T$ (T = Transmitancia) y para el modo de reflectancia la absorbancia corresponde al $\log 1/R$ (R = Reflectancia relativa) siendo la reflectancia relativa la relación $R_{\text{muestra}}/R_{\text{referencia}}$ (Bertrand y Dufour, 2000; Burns y Ciurczak, 1992; Osborne et al., 1993; Williams, 1987).

En el caso del modo de reflectancia la energía emitida por la superficie de la muestra está formada por dos componentes, la de reflectancia especular y la de reflectancia difusa. La reflectancia especular descrita por las leyes de Fresnel no resulta de interés porque no aporta información sobre la composición de la muestra y por lo tanto se deben optimizar las medidas intentando minimizar el efecto de esta componente que solo aporta ruido. Por lo contrario, la reflectancia difusa tiene lugar en todas las direcciones como consecuencia de los procesos de absorción y dispersión y por ello es la base de las medidas cuantitativas en NIR. Esta componente predomina en los casos en los que la materia es débilmente absorbente a la longitud de onda incidente, lo que origina una gran penetración de la radiación.

4.3. Interpretación espectral NIR

La interpretación espectral NIR se centra en estudiar la absorbancia a partir de la luz transmitida o reflejada asumiendo que en ambos casos se obedece la ley de Beer-Lambert. La citada ley establece que la absorbancia a cualquier longitud de onda es proporcional al número o concentración de moléculas absorbentes presentes en el camino recorrido por la radiación (Murray, 1993).

El espectro vibracional es característico para cada molécula presentando diferente absorción para cada frecuencia del espectro NIR (Burns y Ciurczak, 1992). Los enlaces que intervienen fundamentalmente son -CH, -NH, -OH y -CO en las diferentes bandas del espectro como se muestra en la figura 19-a. La intensidad de las bandas NIR dependen del cambio de momento

dipolar y de la anarmonicidad del enlace. Los átomos de hidrógeno al ser ligeros tienen un papel fundamental originando vibraciones más amplias cuando sufren tensión y mayores desviaciones en el comportamiento armónico lo que se refleja notablemente en la absorción de bandas. En consecuencia, casi todas las bandas de absorción observadas en el NIR proceden de sobretonos y bandas de combinación de vibraciones fundamentales que se producen en el MIR, donde están implicados los grupos H-átomo u otras combinaciones de vibraciones de tensión o flexión formadas por los citados grupos. Además, los puentes de hidrógeno también afectan a la señal espectral por lo que también incorporan información sobre las estructuras cristalinas de las sustancias.

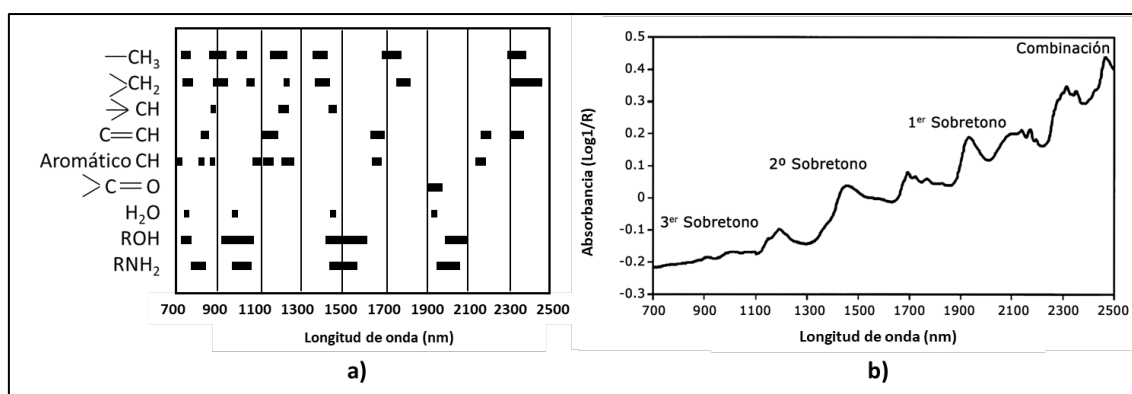


Figura 19: (a): Asignación de las bandas de absorción en la región NIR. (b): Características generales de un espectro NIR. (Fuente: adaptado de Osborne y Fearn 1986).

Esta misma información se puede observar en el espectro NIR en el cual se representan los valores de absorbancia obtenidos en las diferentes longitudes de onda (Figura 19-b) pudiéndose observar que las bandas de combinación tienen señales de mayor intensidad que los sobretonos.

Los espectros NIRS resultantes son de baja selectividad estructural, caracterizados por presentar bandas muy anchas que se componen de muchas absorciones estrechas y superpuestas. Esto origina que no se pueden encontrar correlaciones entre las longitudes de onda y el compuesto que forma parte de la absorción. A pesar de ello, la información espectral NIR puede aportar información analítica de los enlaces moleculares o de grupos funcionales específicos cuando se combina con la aplicación de análisis multivariantes.

4.4. Instrumentación

El esquema básico de un espectrómetro NIR cuenta con los siguientes elementos:

- ❖ Fuente de radiación
- ❖ Sistema selector de longitudes de onda
- ❖ Compartimento de muestra
- ❖ Detector

La señal amplificada y convertida en una señal digital es transmitida a un ordenador que precisa de un software específico para el almacenamiento y procesado (Bertrand y Dufour, 2000; Shenk y Westerhaus, 1995).

A continuación, se describen cada uno de los elementos básicos que integra un equipo NIRS así como los posibles modos de registros. A lo largo del apartado se mencionan las características de los equipos empleados para la adquisición de espectros en el presente trabajo. Se utilizaron dos equipos, un espectrofotómetro NIR de sobremesa Foss NIRS System 5000 y un NIR portátil MicroNIR™ 1700 (Figura 20).



Figura 20: Equipos NIRS. Imagen de la derecha equipo Foss NIRS System 5000 e imagen de la izquierda equipo MicroNIR™ 1700.

❖ Fuente de radiación

Es el componente capaz de generar un haz de luz para irradiar la muestra. Se trata de una fuente térmica en la cual la radiación se produce por el calentamiento de un filamento. La lámpara de tungsteno/wolframio-halógeno de alta temperatura se emplea tanto en espectrómetros NIR de sobremesa como en los miniaturizados. El filamento de wolframio se encuentra en una célula de cuarzo que resiste las elevadas temperaturas en presencia de atmósfera de gas halógeno la cual favorece que el wolframio vaporizado regrese al filamento alargando así la vida útil de la lámpara (DeThomas y Brimmer, 2002). Esta fuente de elevada intensidad de emisión proporciona una radiación continua en la zona NIR (Blanco y Villarroja, 2002; Stark y Luchter, 2003). El control de temperatura debe de tenerse en cuenta en el caso de los espectrómetros miniaturizados, ya que no sólo están destinados a utilizarse en el laboratorio en un entorno constante, sino también sobre el terreno en condiciones variables.

Otras fuentes de radiación alternativas para los espectrómetros portátiles son de tipo Diodo Emisor de Luz (LEDs). Se trata de elementos semiconductores fabricados con materiales como el Arseniuro de Galio (GaAs) o el Arseniuro de Indio y Galio (InGaAs), por ejemplo. Al aplicar una corriente eléctrica, los electrones y huecos electrónicos de los semiconductores se recombinan y el exceso de energía se emite en forma de fotones. Los LED pueden hacerse muy pequeños y resistentes; no necesitan mucha potencia y son baratos. El inconveniente es que proporcionan un escaso ancho de banda de emisión existiendo un limitado número de LED disponibles que emitan en la región NIR.

❖ Sistema de selección de longitudes de onda

Todos los equipos necesitan un sistema de selección de longitudes de onda excepto los que usan fuentes de radiación LEDs. Este componente es fundamental para poder obtener un buen nivel de sensibilidad ya que se encarga de proporcionar un ancho de banda preciso y exacto para la longitud de onda con interés analítico y poder proporcionar señales con una relación señal/ruido satisfactorias.

Los equipos NIRS pueden ser clasificados en función del dispositivo que emplean para la selección de longitudes de onda en sistemas dispersivos o no dispersivos.

Dentro de los equipos dispersivos los más comunes son los que disponen de sistemas monocromadores como sistema de selección de longitud de onda. Estos están formados por un conjunto de colimadores de los haces de entrada y salida junto con un elemento dispersante como son las redes de difracción (Blanco y Villarroya, 2002; Stark y Luchter, 2003). Estas características técnicas permiten que la muestra sea iluminada con un alto número de longitudes de onda dando origen a un espectro de absorción en continuo. El inconveniente es la complejidad y el mayor coste de los equipos.

Los equipos no dispersivos son los más empleados con posibilidad de tener mayor variedad de sistemas de selección de onda como los formados por filtros convencionales, filtros optoacústicos (AOTF, Acusto-Optic Aunable Filter) e instrumentos de transformada de Fourier (FT). La selección de longitudes de onda mediante filtros está basada en la interposición de materiales específicos entre la muestra y la fuente de radiación, los cuales permiten el paso de longitudes de onda discretas de forma selectiva. Estas características técnicas permiten que la muestra sea iluminada mediante un número reducido de longitudes de onda presentando espectros de absorción discontinuos. Los equipos son más simples y baratos.

En el caso de los equipos empleados en este trabajo, el equipo Foss NIRS System 5000, está incluido dentro de los equipos con sistemas dispersivos. La radiación generada en la lámpara se dirige mediante un espejo a una red holográfica cóncava que dispersa la luz blanca incoherente en longitudes de onda individuales transformándola en luz coherente, es decir, tiene la misma frecuencia, amplitud y fase o una diferencia constante. Permite el movimiento de la red y cambio de posición del ángulo respecto al haz de luz incidente recorriendo de esta manera todo el espectro NIR. La red holográfica proporciona un espectro disperso en el que junto a las líneas de primer orden (las más intensas) aparecen líneas de órdenes superiores. Estas líneas de órdenes superiores deben eliminarse mediante filtros, los cuales están montados en un soporte cuyas posiciones están controladas por un motor y a la vez, perfectamente sincronizado con la red holográfica.

En el caso del equipo MicroNIR™ 1700, éste dispone de una tecnología óptica de alta precisión utilizando como elemento dispersivo un Filtro Lineal Variable de película delgada (LVF). Los LVF funcionan como filtros ópticos de paso de banda de Fabry-Perot que presentan un revestimiento situado en forma de cuña con grosor decreciente a través de los filtros, lo que provoca una variación lineal en las longitudes de onda transmitidas. Los LVF suelen ser económicos,

consumen poca energía, son de tamaño reducido y robustos, ofreciendo una buena resolución espectral. El inconveniente es que precisan de complejos detectores de matriz.

❖ Compartimento de muestra

Los equipos NIR están diseñados para poder alojar y analizar muestras de distinta naturaleza sin necesidad de preparaciones previas. Los equipos disponen de diferentes compartimentos de muestra que se acoplan al equipo y algunos de ellos disponen de la posibilidad de acoplar sondas fibra óptica.

En función de la situación del detector respecto de la muestra y del tipo de accesorio que se emplea para el registro de muestras se tienen distintos modos de análisis NIRS, considerando cuatro principales: reflectancia, transmitancia, interactancia y transflectancia (Figura 21).

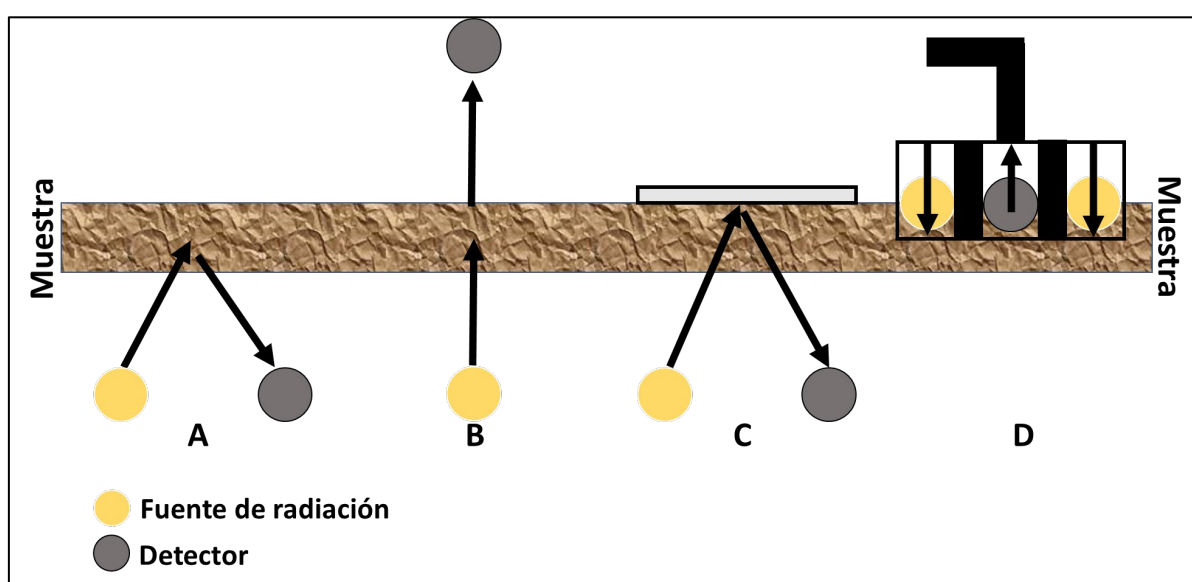


Figura 21: Esquema que representa los distintos modos de análisis NIRS. A) Reflectancia, B) Transmitancia, C) Transflectancia y D) Interactancia (Fuente: adaptado de Zamora Rojas, 2013).

- **Modo reflectancia (Figura 21-A):** es el más empleado en muestras sólidas y semisólidas y se basa en la cuantificación de la luz reflejada y de la luz que ha penetrado en la superficie de la muestra, conocida como reflectancia difusa.
- **Modo transmitancia (Figura 21-B):** es el que se emplea en el caso de muestras gaseosas, líquidas, semilíquidas y sólidas. En este caso se mide la luz que ha atravesado la muestra que es cuantificada por el detector que se sitúa en el lado opuesto de la fuente de radiación.
- **Modo transflectancia (Figura 21-C):** es también empleado en muestras líquidas y semilíquidas y podemos describirlo como un híbrido de los dos modos descritos anteriormente. En este caso la radiación atraviesa la muestra y la radiación es reflejada por una superficie reflectante cuando entra en contacto con la misma, para atravesar

de nuevo la muestra y ser cuantificada por el detector. Generalmente el material reflectante suele ser una superficie de oro.

- **Modo interactancia-reflectancia (Figura 21-D):** se basa en la utilización de fibra óptica donde el detector está separado de la fuente de radiación, pero ambos se sitúan en contacto directo con la superficie del producto (Osborne, 2000).

Otra forma de clasificar los equipos es en función del tamaño y modo de operación, siendo entonces clasificados como at-line (equipos de sobremesa de gran tamaño y muy sensibles), on-line (permiten ser transportados hasta el lugar de predicción por su reducido tamaño) y on-site (insertados en el lugar de producción). Los modos de análisis NIRS de reflectancia e interactancia son los más indicados para desarrollar aplicaciones in situ, en el campo, en la línea de procesado o para colocarlos en sensores remotos dada la versatilidad en cuanto al modo de presentación de muestra para llevar a cabo el análisis.

❖ Detectores

La mayoría de los espectrómetros usan un solo detector, pero también hay la posibilidad de que se acoplen varios basados en redes de diodos lineales o multidimensionales, dependiendo de las longitudes de onda que se vayan a detectar. Hay detectores de fotones, como son los fotoconductores y fotodiodos, y detectores térmicos. El detector de plomo y azufre (PbS) es el más común porque ofrece una sensibilidad adecuada entre 900 y 2.600 nm y es el que utiliza el equipo Foss NIRS System 5000 de sobremesa con el que se ha trabajado para la obtención de los espectros de la presente memoria. En el caso del equipo portátil empleado utiliza un detector de barrera de diodos InGaAS de 128 pixeles acoplado directamente al filtro LVF.

En las figuras 22, 23 y 24, se muestran los esquemas de los equipos utilizados en el presente trabajo, en el que se han empleado diferentes modos de registro para muestras sólidas y líquidas.

La figura 22 muestra el esquema del equipo Foss NIRS System 5000 equipado con una sonda de fibra óptica de tipo Bundle (haz) regular 210/210, para la aplicación directa sobre las muestras. La sonda tiene una ventana de cuarzo de 5cm x 5cm. Consta de un detector de reflectancia que usa como referencia una placa cerámica. La sonda se une al equipo mediante una conexión de 1.5 metros de fibra óptica. El uso de este tipo de sondas limita el rango espectral en que se pueden realizar las medidas, en este caso la zona óptima se encuentra en 1.100 - 2.000 nm con intervalos de 2 nm. No opera por encima de 2000 nm porque se producen importantes atenuaciones de la señal debido principalmente a la fuerte absorción de grupos -OH que pueden estar presentes en la fibra óptica (Stark y Luchter, 2003; NIRSystems, 1995).

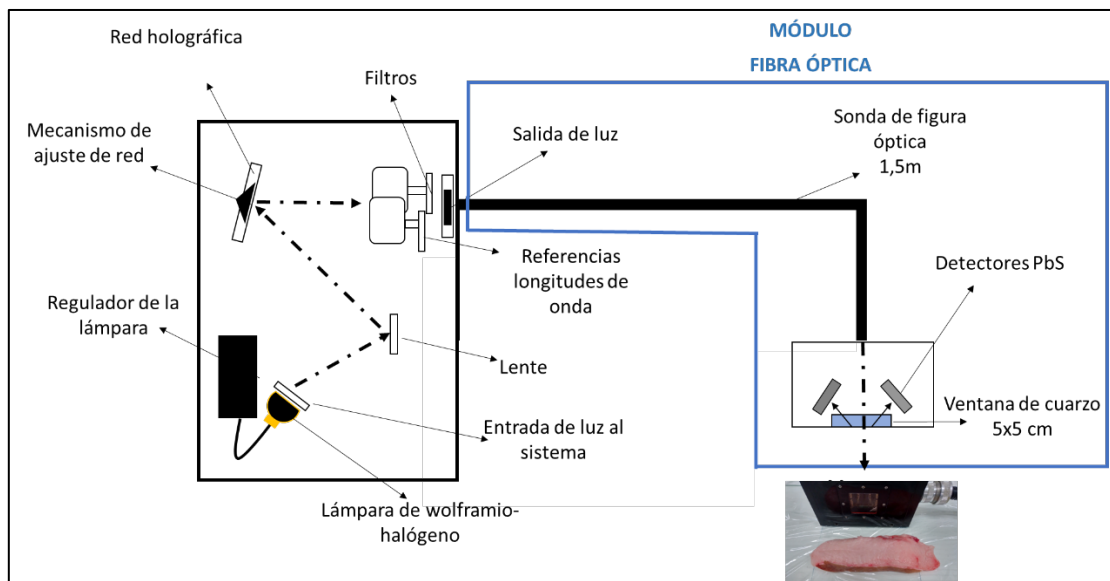


Figura 22: Esquema del equipo Foss NIRS System 5000 para registros con sonda de fibra óptica. Modo de análisis interactancia.

La figura 23 muestra el esquema del equipo Foss NIRS System 5000 equipado con un módulo de giro (módulo transport) que permite un rango espectral de medida de 1.100 - 2.500nm con intervalos de 2 nm. El modo de operar con este compartimento es mediante el modo de transmisión mediante el uso de las cápsulas cam-lock de 0,1mm de paso óptico y fondo de material reflectante.

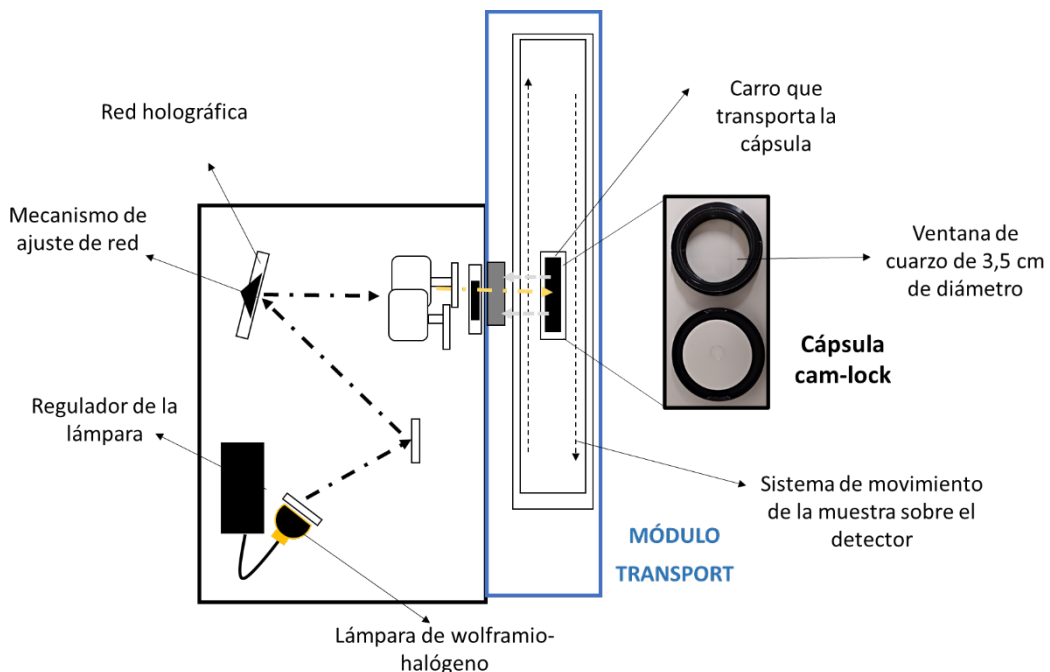


Figura 23: Esquema del equipo Foss NIRS System 5000 para registros de muestras líquidas con cápsulas cam-lock. Modo de análisis transflectancia.

La figura 24 muestra el esquema del equipo portátil MicroNIR™ 1700 el cual no precisa de ningún tipo de accesorio para registro de muestras sólidas. Únicamente se sitúa la ventana del equipo de forma perpendicular sobre la muestra intacta. El rango espectral de medida es de 908-1.676 nm en modo de reflectancia con un intervalo aproximado de 6,2 nm.

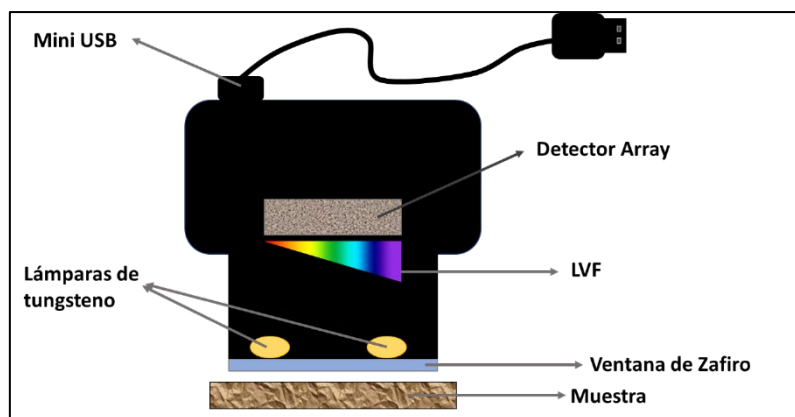


Figura 24: Esquema del equipo portátil MicroNIR 1700. Modo de análisis reflectancia (Fuente: Elaboración propia a partir de Baca Bocanegra, 2019).

4.5. Ventajas e inconvenientes de la espectroscopía NIR

Ventajas

Las principales ventajas que presenta la espectroscopía NIR residen en que es una técnica no invasiva ya que el análisis se lleva a cabo sin entrar en contacto con la muestra o simplemente con un contacto superficial. Además, es no destructiva debido a que los niveles de energía incidentes en la región NIR son inferiores a la energía requerida para romper enlaces covalentes.

Como proporciona información sobre la naturaleza física y química en una misma medida es capaz de cuantificar tanto parámetros físicos como químicos, además de determinar parámetros correlacionados de forma indirecta con diversos compuestos que forman la materia, por lo tanto, es multiparamétrica ya que permite determinar varios parámetros simultáneamente.

Es una técnica multi-producto ya que se puede emplear en diversas materias siendo posible su uso en muestras sólidas, líquidas o pastosas y gaseosas lo que incrementa sus posibilidades de aplicación.

No se requiere tratamiento previo al análisis por lo que no genera subproductos ni precisa del empleo de disolventes orgánicos contaminantes siendo considerada una técnica respetuosa con el medioambiente.

La precisión de esta técnica es equivalente a los métodos de referencia y su reproducibilidad, en muchas ocasiones, es mayor que en el método de referencia ya que no existe tratamiento de muestra.

El coste de análisis por muestra es bajo debido a que no necesita consumibles y requiere de bajo coste de mano de obra obteniendo un elevado número de análisis en periodos cortos de tiempo.

Los resultados de los análisis se obtienen en segundos o incluso de forma continua, debido a la escasa o nula preparación de la muestra, lo cual permite tomar decisiones casi inmediatas en función de los resultados.

Los actuales diseños instrumentales, que han sido posibles gracias a los avances en óptica y electrónica, ofrecen la ventaja de disponer de equipos miniaturizados de fácil transporte y gran aplicabilidad para llevar a cabo trabajos en campo. Las conexiones en red o inalámbricas también permiten trabajar con equipos interconectados que llevan a cabo registros en línea con capacidad de almacenar los datos en una memoria e incluso su computación en nubes (cloud computing).

Inconvenientes

No es un método universal por lo que requiere del desarrollo de modelos específicos para su aplicación en muestras bien definidas y similares a las empleadas en la calibración.

La etapa de desarrollo de los modelos multivariantes es costosa, debido a que necesita personal cualificado para generar bases de datos, desarrollar modelos, supervisarlos y recalibrarlos siempre que sea necesario.

El desarrollo de modelos robustos requiere de un largo periodo de desarrollo e implementación partiendo de la adquisición de muestras bien definidas de las cuales se hayan analizado los datos de referencia objeto del modelo predictivo.

Los instrumentos son caros pero la amortización es rápida debido al ahorro en análisis de laboratorio, mano de obra, instalación y tiempo.

4.6. Aplicaciones de la tecnología NIR en el sector del cerdo ibérico

La tecnología NIRS ha sido ampliamente utilizada en el sector cárnico tanto para predecir parámetros químicos, físicos, tecnológicos y sensoriales como para la clasificación / autenticación mediante métodos cualitativos (Arce et al., 2009; Cáceres-Nevado et al., 2019; Garrido-Varo et al., 2004; Hernández-Ramos et al., 2020; Pérez-Marín et al., 2021; Prevolnik et al., 2011; Prieto et al., 2009; Weeranantanaphan et al., 2011).

En el caso del sector cárnico porcino son diversos los estudios que han perseguido el predecir parámetros en carne como el pH, la capacidad de retención de agua, el porcentaje de grasa infiltrada, los contenidos de humedad, proteína y minerales y los parámetros de color (L^* , a^* , b^*) (Balage et al., 2015; Brøndum et al., 2000; Čandek-Potokar et al., 2006; González-Martín et al., 2002; Kapper, Klont, Verdonk, y Urlings, 2012; Kapper, Klont, Verdonk, Williams, et al., 2012; Liao et al., 2010; Mishra et al., 2021; Prevolnik et al., 2010; Prieto et al., 2017; Savenije et al., 2006). También son numerosos los estudios que predicen el perfil lipídico y/o los sumatorios de AGS, AGM y AGP (Gjerlaug-Enger et al., 2011; González-Martín et al., 2002; Pérez-Juan et al., 2010; Pérez-Marín et al., 2009; Prieto et al., 2014, 2018; Sørensen et al., 2012) así como del índice de yodo (Gjerlaug-Enger et al., 2011; Prieto et al., 2014, 2018; Sørensen et al., 2012).

En el caso del sector del cerdo ibérico la aplicabilidad de la tecnología NIRS se ha centrado en la predicción de la composición de la grasa debido a su correlación con la calidad de las piezas nobles de la canal del cerdo (Daza, Mateos, et al., 2007). Las primeras investigaciones llevadas a cabo remontan al año 1992 con el fin de predecir los cuatro ácidos grasos mayoritarios en grasa fundida de la canal, empleando el modo de transmitancia (De Pedro et al., 1992). Estos resultados prometedores dieron lugar al desarrollo de nuevos modelos predictivos combinando diversas metodologías de análisis y desarrollando diversos algoritmos multivariantes de regresión. Fruto de estas investigaciones se ha demostrado que el rango de error en la predicción de los ácidos grasos es pequeño concluyendo que podría reemplazar el tradicional análisis cromatográfico (Fernández-Cabanás et al., 2007; García-Olmo et al., 2001; González-Martín et al., 2002; Pérez-Marín et al., 2007, 2010).

El avance de la tecnología ha permitido adaptar la tecnología NIRS con el fin de predecir el perfil lipídico de la grasa a diferentes tipos de muestreo como pueden ser en grasa intacta y/o fundida, en piezas nobles de la canal como el lomo o en productos derivados (Fernández-Cabanás et al., 2011; González-Martín et al., 2005; Pérez-Marín et al., 2007). Las continuas investigaciones han hecho posible la implementación de la tecnología NIRS en la industria mediante la toma de registros en muestras de tejido adiposo intacto usando equipos monocromadores equipados con fibras ópticas (Cáceres-Nevado et al., 2019; De Pedro et al., 1992; González-Martín et al., 2003, 2005), así como equipos portátiles de menor tamaño que permiten operar en campo (Horcada et al., 2020; Pérez-Marín et al., 2009, 2021; Zamora-Rojas et al., 2012).

Zamora-Rojas et al. (2013) demostró la viabilidad del uso de sensores NIRS portátiles para determinar la concentración de los cuatro ácidos grasos principales (oleico, palmítico, esteárico y linoleico) in situ en la línea de faenado de canales en matadero. Los errores que se obtuvieron fueron aceptables teniendo en cuenta la posibilidad que ofrece esta técnica de conocer a tiempo real dicha información.

Los equipos portátiles NIRS también han permitido la predicción de los cuatro ácidos grasos interesantes en el sector del cerdo ibérico a través de la piel del animal vivo. Los resultados mostraron mayores errores que en la toma de registros sobre la grasa subcutánea intacta libre de piel (Pérez-Marín et al., 2009).

Los tratamientos quimiométricos aplicados también han sido diversos, para conseguir modelos cualitativos y cuantitativos robustos, empleando tanto algoritmos no lineales y ANN (Guillén et al., 2010; Hernández-Ramos et al., 2020; Hervás et al., 1994) como algoritmos lineales a partir de variables espectrales (Arce et al., 2009; De Pedro et al., 1995; García-Olmo et al., 2009; Horcada et al., 2020; Pérez-Marín et al., 2009; Zamora-Rojas et al., 2012).

Otra de las aplicaciones de la tecnología NIRS ha sido la clasificación en función de las diferentes categorías comerciales de los productos ibéricos. Se han desarrollado modelos multivariantes cualitativos para la autenticación/clasificación en función de las categorías asignadas según la raza y el régimen de alimentación. Para ello se han registrado los espectros NIRS en el animal vivo, en la piel de las canales, en carne fresca y/o en la grasa subcutánea de las canales (Arce et al., 2009; De Pedro et al., 1995; García-Olmo et al., 2009; Hervás et al., 1994; Horcada et al., 2020; Pérez-Marín et al., 2021; Zamora-Rojas et al., 2012). Estudios recientes también han

aplicado la tecnología NIRS a productos derivados del cerdo ibérico (chorizo, salchichón y lomo envasado) para su clasificación según las categorías comerciales (Ortiz, León, et al., 2021b; Tejerina et al., 2021; Ortiz, León, et al., 2021a) así como para autenticar las piezas en función de la raza (raza ibérica o raza de cerdo blanco) (Guillén et al., 2010).

Más recientemente también se ha evaluado la aplicabilidad de la imagen hiperespectral NIRS para el control de la calidad de la carne de forma no destructiva. Al igual que la tecnología NIRS tiene potencial para clasificar por aspectos tecnológicos (carnes PSE o DFD) así como predecir y evaluar atributos de color, vetado, exudación, pH, contenido de grasa y perfil lipídico (Kobayashi et al., 2010; Kucha et al., 2021; Qiao, Ngadi, et al., 2007; Qiao, Wang, et al., 2007).

5. QUIMIOMETRÍA

La quimiometría es una disciplina que utiliza las matemáticas, la estadística y la lógica formal para diseñar o seleccionar los procedimientos óptimos de experimentación, así como proporcionar la máxima información analizando los datos y sistemas químicos (Massart et al., 1997).

El elevado número de variables que se obtiene a través de ciertas técnicas analíticas conlleva la dificultad de la interpretación, lo que requiere la aplicación de diversas técnicas quimiométricas multivariantes. En el caso de la espectroscopía NIR se obtiene una señal única para cada muestra la cual contiene toda la información física y química.

En función del tipo de información que se persigue obtener (categórica o de escala) los métodos se dividen en cualitativos o cuantitativos. En esta tesis doctoral se ha utilizado tanto análisis cuantitativos como cualitativos, por lo que se va a hacer referencia a ambos.

5.1. Etapas del proceso de modelado NIRS

El proceso de desarrollo y evaluación de un modelo quimiométrico requiere una serie de etapas previas y comunes tanto para el análisis cualitativo como para el cuantitativo (Blanco y Alcalá, 2005). En la figura 25 se presenta un esquema de las etapas previas al desarrollo de los modelos y llevadas a cabo en los trabajos relacionados con la presente memoria. A continuación, se describen cada una de ellas:

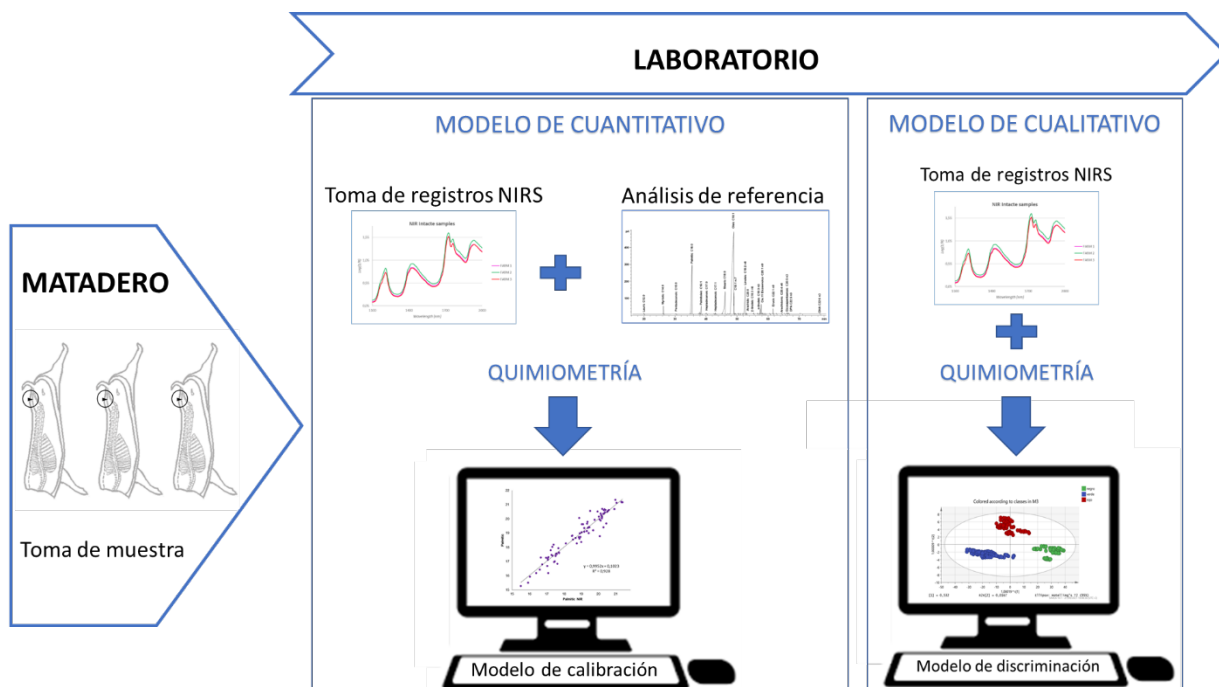


Figura 25: Diagrama de las etapas básicas para el desarrollo de un modelo de calibración NIRS.

5.1.1. Muestreo y selección del conjunto de calibración

El conjunto de muestras que van a ser seleccionadas para el desarrollo del modelo (muestras de calibración) deben de ser representativas de toda la variabilidad del conjunto poblacional lo que va a aportar mayor robustez al método quimiométrico generado. En función de los objetivos del modelo y los parámetros a determinar la variabilidad que se debe cubrir en el conjunto muestral es diferente. Por ejemplo, en modelos cuantitativos se debe tener en cuenta que la variabilidad incluya todo el rango que contemplan los análisis de referencia y en métodos cualitativos que la variabilidad recoja representatividad de origen, campañas, tamaño de partícula, diferentes proveedores u otros criterios que sean determinantes o influyentes en la clasificación.

5.1.2. Métodos de referencia

Los análisis de referencia son necesarios para el desarrollo de modelos cuantitativos. El desarrollo del modelo requiere un planteamiento previo de las variables analíticas a determinar en el laboratorio. Es muy importante que los datos de referencia aporten valores precisos y exactos ya que de estos va a depender la calidad del modelo a desarrollar.

5.1.3. Pretratamientos espectrales

Una vez que se dispone de los espectros crudos de las muestras seleccionadas hay que analizarlos de forma que sirva para detectar algún tipo de efecto en la señal que pueda afectar negativamente al desarrollo de los modelos.

Los principales problemas que presentan los espectros NIR se encuentran asociados a la dispersión de la luz (scattering) originada por las características físicas de la muestra (como puede ser el tamaño de partícula, forma o compactación), a factores externos como la temperatura o humedad y a aspectos relacionados con la medida instrumental, todo ello unido a la forma de los espectros NIR con bandas muy anchas que se solapan (Williams, 1987).

La combinación de pretratamientos da la posibilidad de paliar o eliminar los principales efectos que enmascaran la señal espectral (Mishra et al., 2021). Los pretratamientos comúnmente empleados son:

- **Promediado de espectros:** con esta estrategia se pretende reducir el ruido aleatorio que proviene de la variación instrumental con el fin de aumentar la relación señal/ruido al promediar varias señales analíticas de la misma muestra. Es una estrategia empleada en diferentes ramas de la espectroscopía alcanzando buenos resultados.
- **Corrección del efecto multiplicativo de la dispersión MSC (Multiplicative Scatter Correction):** los efectos de la dispersión de la luz se asocian principalmente a factores físicos como puede ser el tamaño de partícula que compone la muestra. Estos efectos pueden ser aditivos o multiplicativos, afectando a la relación del espectro con las propiedades químicas de la muestra. Mediante este tratamiento se pretende evitar que

los efectos de la dispersión (scattering) se impongan a las propiedades químicas de la muestra. La corrección se efectúa utilizando un espectro ideal, que suele ser el espectro medio del conjunto de muestras. En general, esta corrección mejora la linealidad de los espectros y conserva la información química a la vez que minimiza las diferencias entre los espectros (Geladi et al., 1985; Martens et al., 1983). Presenta el inconveniente de que es necesario realizar de nuevo los cálculos cuando se hace algún cambio en el conjunto de muestras; recalculando el espectro medio y por consiguiente todos los parámetros.

- **Tipificación de la absorbancia SNV (Standard Normal Variate):** al igual que el tratamiento anterior lo que intenta es minimizar la dispersión debida principalmente a factores físicos, como puede ser el tamaño de partícula. Este tratamiento se aplica individualmente a cada espectro y por tanto no necesita el cálculo de un espectro medio o de referencia, ni rehacer los cálculos si se elimina alguna muestra del conjunto inicial. Existe una relación lineal entre este tratamiento y MSC, haciendo que los resultados ofrecidos por ambos métodos sean similares (Barnes et al., 1989; Helland et al., 1995).
- **Corrección de la tendencia DT (Detrend):** este tratamiento se aplica de forma individual a cada espectro e intenta minimizar la curvatura de la línea base que surge como consecuencia del diferente tamaño de partícula y del distinto grado de compactación en su empaquetamiento. Cada espectro tiene una media igual a cero y una desviación estándar distinta a la unidad después de aplicar esta corrección (Barnes et al., 1989).
- **Derivadas:** son una herramienta muy utilizada en el procesado de los espectros NIR porque permiten disminuir sus problemas más característicos: bandas solapadas y variaciones en la línea base ocasionadas por características físicas de las muestras, como pueden ser el tamaño de partícula, empaquetamiento de muestras sólidas y otra serie de factores relacionados con las muestras y su presentación tal y como ya se ha referido anteriormente. El método para el cálculo de las derivadas emplea el método gap o segmento, utilizando la información de un segmento localizado en el espectro para calcular la derivada. Previamente se puede aplicar un suavizado sustituyendo los datos de un segmento por un valor promedio. La utilización de la primera derivada, pendiente de la curva espectral, elimina los términos constantes a todas las longitudes de onda, por lo que corrige desplazamientos de la línea base. La segunda derivada corrige el cambio de pendiente de la curva espectral y, además, corrige los términos que varían de forma lineal con la longitud de onda. No suelen utilizarse derivadas superiores a la segunda ya que suponen un aumento del ruido en las medidas espectrales (Norris y Williams, 1984). Cuando se aplican derivadas y suavizados, los distintos tratamientos aplicados se codifican con una notación de 4 dígitos (a, b, c, d), siendo "a" el orden de la derivada, "b" el número de puntos en los cuales se realiza la derivada, "c" el número de puntos en los cuales se realiza el primer suavizado y "d" el número de puntos en los cuales se realiza el segundo suavizado (Shenk y Westerhaus, 1995). En este método de derivadas y suavizado se introduce una variable que es el segmento en el cual se realizan estas correcciones. Un segmento demasiado pequeño puede aumentar el ruido

espectral, mientras que uno demasiado grande puede hacer que no se represente el comportamiento del espectro en el resultado o eliminar información importante.

La combinación de los pretratamientos Standard MSC, SNV y DT, con posteriores suavizados y derivadas, ofrece un amplio abanico para intentar eliminar o reducir los efectos que enmascaran de alguna forma la señal apropiada para el propósito analítico (Norris y Williams, 1984).

5.1.4. Métodos para reducir el número de variables iniciales

El método más utilizado para la reducción de variables es la descomposición de los datos en componentes principales (Massart et al., 1997), procedimiento que es conocido como Análisis de Componentes Principales (Principal Component Analysis, PCA). Es un método quimiométrico cualitativo que se emplea de forma habitual en las fases previas del análisis multivariante con el objetivo de reducir el número de variables iniciales, sin perder información y de esta manera observar la tendencia de clasificación de las muestras. Se basa en el reconocimiento de pautas no prefijadas, de estructuras y de tendencias en las muestras.

A modo resumen el PCA consiste en (Deane, 1992):

- Estimar la dimensionalidad real de los datos de las muestras estudiadas y reducir esta dimensionalidad manteniendo la información relevante del sistema.
- Calcular un nuevo sistema de coordenadas, para lo que se buscan las direcciones que expliquen la máxima variabilidad de los datos de las muestras. Estos nuevos ejes se denominan "componentes principales" (PCs). Así el primer componente principal es la dirección que explica la máxima variabilidad de los datos de las muestras; el segundo, se escoge que sea perpendicular al primero, y que explique la máxima variabilidad de los datos de las muestras una vez restada la explicada por el primer componente principal y así sucesivamente.
- Definir estos nuevos ejes matemáticamente, mediante los *loadings*, cargas o pesos que son los cosenos de los ángulos que forman cada uno de estos nuevos ejes con los antiguos, y los *scores* o puntuaciones que son las coordenadas en estos nuevos ejes. De tal forma que:

Espectro de la muestra = (score 1 ~ contribución) (*loading* 1) + (score 2 ~ contribución) (*loading* 2) +.....+ ruido espectral (E ~ residual).

De esta manera los *loadings* contienen toda la información espectral y los *scores* la información cuantitativa. Si la muestra está bien definida, el residual (ruido espectral) es muy pequeño.

Los componentes principales se pueden interpretar geoméricamente (Brereton, 2003) de tal forma que el espectro medido a J longitudes de onda, constituye un conjunto de J variables que puede ser descrito como un vector. Se puede construir un espacio de J dimensiones, de tal manera, que cada dimensión corresponda a una de las longitudes de onda, y se pueda representar el mismo objeto como un punto en ese nuevo espacio. Si tenemos M muestras, se

pueden representar como M puntos en el espacio de J dimensiones (Figura 26). El objetivo del PCA es hallar las direcciones en que están agrupados los M puntos de los objetos en el espacio de J dimensiones, y reducir el sistema inicial J dimensional a uno A dimensional, de modo que $A < J$, manteniendo la información relevante del sistema. Geométricamente es un cambio de ejes, representando esas muestras en un sistema de coordenadas con un número inferior de ejes al utilizado inicialmente.

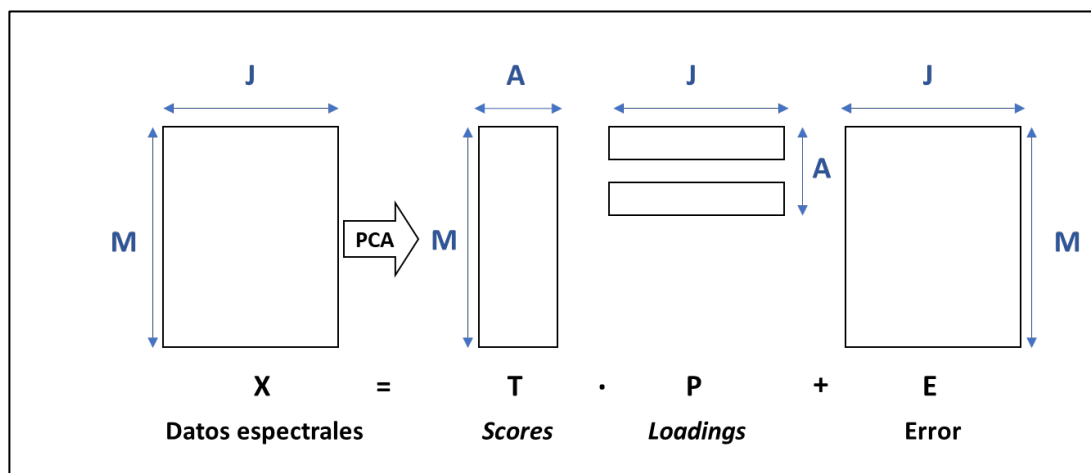


Figura 26: Descomposición de un conjunto de espectros mediante análisis de componentes principales (Fuente: Hernández Hierro, 2008).

Otra propiedad muy importante de los PCs es la ortogonalidad. Así el método busca las direcciones ortogonales que expliquen la máxima variabilidad de los datos de las muestras, utilizando estas direcciones como nuevos ejes de coordenadas o PCs.

El método para el procesado de datos o escalado será un centrado de datos, el valor medio corresponde al centro del modelo y los valores de todas las variables se refieren a ese centro.

La detección de espectros “outliers” o espectros fuera de la población se lleva a cabo utilizando la distancia de Mahalanobis (H). Se establece la diferencia espectral de una muestra respecto a la media espectral del conjunto de muestras (H), tomando como valor límite $H=3$, de forma que aquellos espectros cuya distancia H sea superior a 3,0 se desechan. Las muestras con los datos espectrales originales se ordenan de acuerdo con la distancia de Mahalanobis (H) obtenida anteriormente, esto resulta muy útil en procesos posteriores a la hora de construir los grupos de validación cruzada, de manera que los subgrupos resulten homogéneos. También mediante este proceso de análisis de componentes principales se puede observar qué muestras resultan espectralmente diferentes, sin rebasar el valor de $H=3$, con objeto de decidir su inclusión en el conjunto de calibración.

Durante el análisis de muestras es importante registrar la distancia de Mahalanobis a una muestra vecina (NH). Usando el valor de NH pueden crearse subgrupos de muestras que presentan características espectrales similares dentro del conjunto muestral lo cual va a permitir en un momento dado seleccionar un grupo de muestras representativo de cada subgrupo para el conjunto global de muestras.

5.2. Análisis cuantitativos

Los datos obtenidos mediante NIRS son muy complejos debido al elevado número de variables asociados a cada muestra, como consecuencia es necesario el desarrollo de métodos capaces de relacionar múltiples variables, conocidos como Métodos de Calibración Multivariantes. El objetivo que persiguen es establecer una relación entre la respuesta instrumental y la propiedad o parámetros a determinar.

Los métodos cuantitativos se pueden clasificar de forma general en dos grupos: métodos univariantes o multivariantes y, a su vez, se dividen entre modelos lineales y no lineales dependiendo de los algoritmos matemáticos empleados (Figura 27). Tradicionalmente los modelos lineales han sido los más utilizados debido a que presentan mayor sencillez siendo diversos los métodos incluidos en este grupo (Næs et al., 2002). Cuando la interpretación se lleva a cabo mediante variables originales se emplea la regresión lineal múltiple (MLR por sus siglas en inglés) y cuando se trabaja sobre variables reducidas se usa la regresión por PCs o la regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS por sus siglas en inglés) (Brereton, 2003; Massart et al., 1997). Este último es quizá el más usado, al presentar mayor precisión, y es el algoritmo más rápido (Agelet y Hurburgh, 2010).

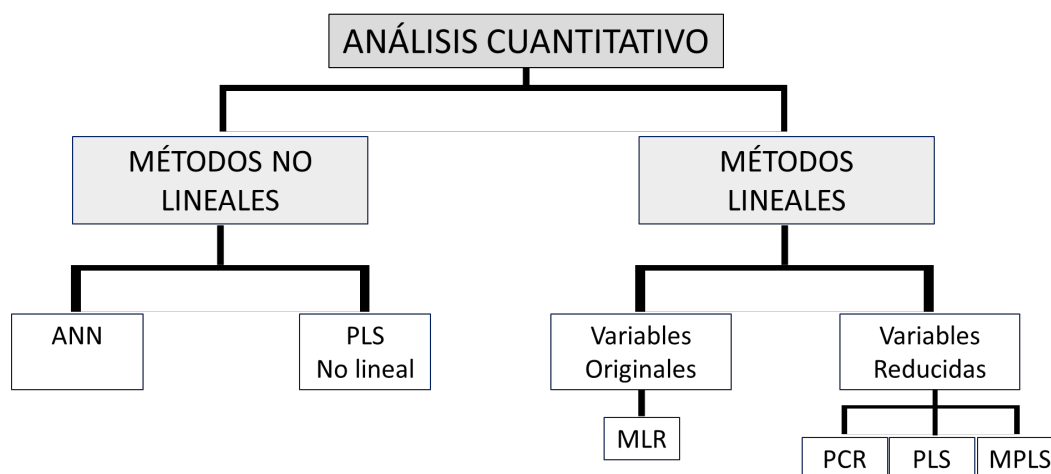


Figura 27: Clasificación general de los métodos de calibración.

Como la relación a modelar en los datos espectrales no siempre es lineal también se aplican algoritmos no lineales que tienen potencial para mejorar la confiabilidad y la reproducibilidad de los resultados (Hernández-Ramos et al., 2020; Zareef et al., 2020). Todos los métodos resultan exitosos en casos específicos ya que un modelo que funciona bien en una aplicación puede no serlo para otra (Balabin et al., 2007; Hernández-Jiménez et al., 2020; Iñón et al., 2006; Mahesh et al., 2015; Mohamed et al., 2018; Vásquez et al., 2018).

Regresión por mínimos cuadrados parciales modificados.

La regresión por mínimos cuadrados parciales modificados (MPLS) es un método de análisis cuantitativo habitual en el análisis multivariante. Se basa en que la información contenida en las variables medidas se puede concentrar en un número menor de variables sin pérdida de información relevante. La regresión se realiza con estas nuevas variables, no con los datos originales, simplificando el modelo de calibración y la interpretación de los resultados (Brereton, 2003).

El método PLS de calibración fue introducido en 1975, y fue presentado como una modificación del algoritmo de mínimos cuadrados incrementales iterativos no lineales (Nonlinear Iterative Partial Least Squares, NIPALS), para hallar componentes principales (Wold, 1975). Es útil para resolver problemas de calibración que contienen un número elevado de variables y relativamente pocas muestras, como es el caso de la espectroscopía NIR, basándose en una reducción de variables. Estas nuevas variables, denominadas variables latentes, factores o componentes son combinación lineal de las variables originales.

El método MPLS, es un PLS cuya modificación reside en que los residuales NIR a cada longitud de onda (obtenidos después de calcular cada factor, variable latente o componente) se estandarizan (es decir se dividen por la desviación estándar de los residuales a cada longitud de onda) antes de calcular el siguiente factor o variable latente; lo que hace a este algoritmo más estable y preciso que un PLS normal (Infrasoft International LLC, 2000).

Durante la etapa de calibración, el algoritmo PLS utiliza tanto la información contenida en la matriz de los datos espectroscópicos (matriz X), como la información contenida en la matriz de datos de referencia (matriz Y). Teniendo en cuenta ambas informaciones, el método reduce el impacto de grandes pero irrelevantes variaciones en la matriz X en el calibrado, buscando la máxima variabilidad en la matriz X y la mayor correlación con la matriz Y (Høskuldsson, 1996). Además, el método PLS realiza la regresión en un espacio ortogonal, evitando los problemas derivados de la colinealidad entre las variables, y el centrado de los datos se realiza en las matrices X e Y.

En la figura 28, se observa la descomposición de la matriz espectral y la que contiene los parámetros a modelar (X e Y) mediante PLS, siendo T, matriz de las puntuaciones (*scores*), el nexo común entre ambas. Las matrices P y Q representan los pesos (*loadings*), mientras que las matrices E y F representan los errores o residuales de la descomposición de las diferentes matrices. El número de muestras corresponde a M; A es el número de variables latentes obtenidas y N indica el número de parámetros a modelar (Brereton, 2003; Massart et al., 1997).

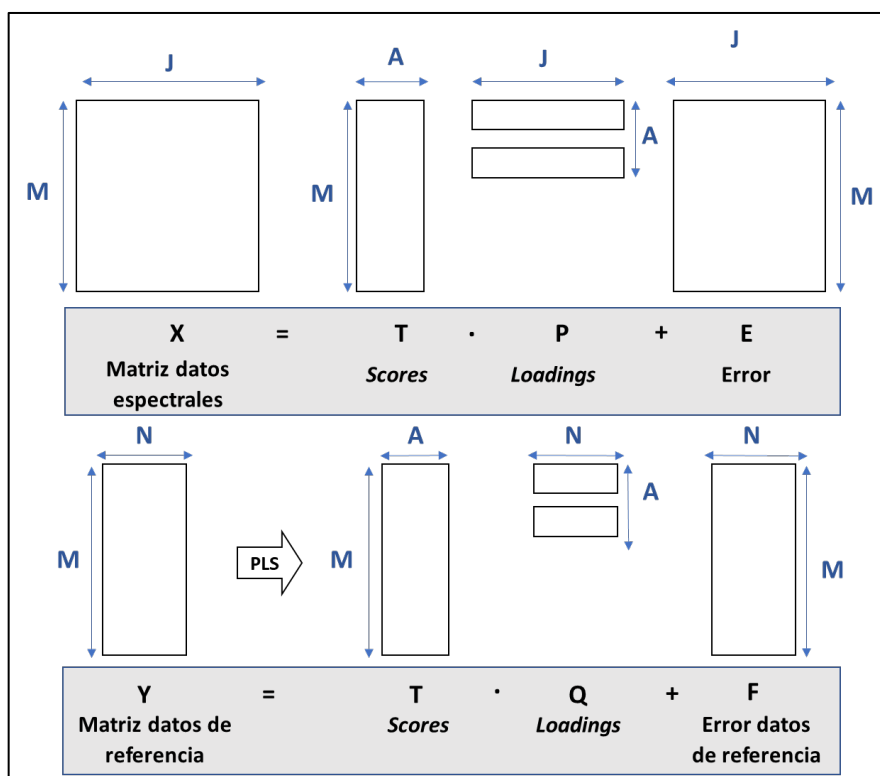


Figura 28: Esquema general de obtención de modelos PLS. (Fuente: Hernández Hierro, 2008).

En la matriz Y, el número de columnas (N) representa el número de parámetros a modelar, si $N=1$ se estaría modelando para un único parámetro, dando lugar al denominado PLS 1. Sin embargo, si N toma un valor distinto a la unidad se estarían modelando varios parámetros de forma simultánea, dando lugar al denominado PLS 2.

El objetivo de la calibración es obtener unos parámetros que permitan calcular la concentración en futuras muestras, de forma que el residual (diferencia entre el valor de referencia y el predicho) de los datos calculados sea el menor posible. Teniendo en cuenta esto se evalúa la capacidad de predicción del modelo, buscando que los primeros factores o variables latentes contengan la mayor información para la predicción de las muestras. La elección del número de factores o variables latentes se puede realizar de diversas formas siendo una de las más extendidas la validación cruzada. En esta validación el conjunto original es dividido en varios grupos de forma que se utiliza un grupo para comprobar los resultados (validar) y el resto para construir el modelo, el proceso se repite tantas veces como subgrupos se formen. Esta forma de trabajar trata de evitar los sobreajustes, atendiendo al valor del error estándar de validación cruzada (SECV). El SECV puede ser definido, de forma aproximada, como el equivalente al error estándar de predicción (SEP) de 10 muestras elegidas al azar (Brereton, 2003; Massart et al., 1997).

En la figura 29, se puede observar de forma esquemática el proceso de validación cruzada: generación de subgrupos y paso de todos ellos por los conjuntos de calibración y validación.

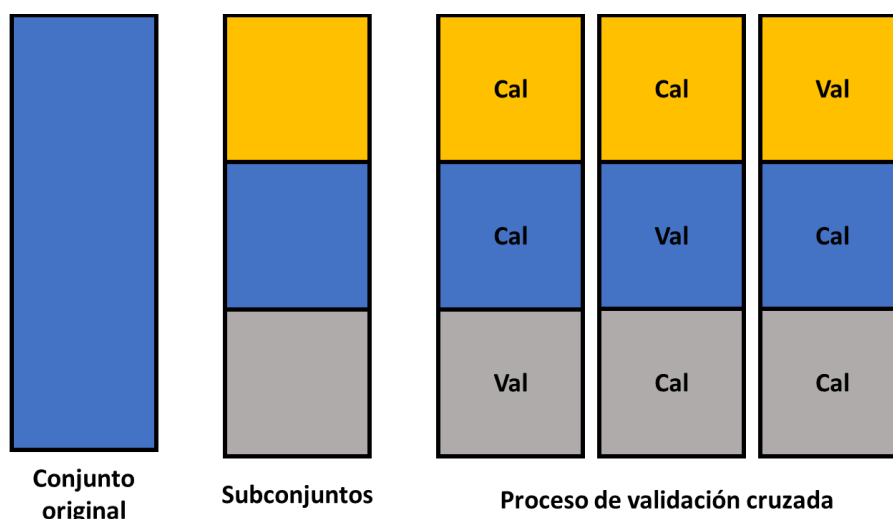


Figura 29: Esquema del proceso de validación cruzada.

En el proceso de elección del número de factores o variables latentes se comienza por establecer un SECV mínimo y a partir de este se calcula el máximo SECV aceptable (5% superior al mínimo). Se identificará el SECV que con el menor número de factores o variables latentes sea inferior al máximo SECV aceptable, eligiéndose ese número de factores o variables latentes para desarrollar el modelo.

Durante este proceso también son detectadas muestras con altos residuales, diferencias entre el valor de referencia y el predicho. Se utiliza el criterio T, de forma que aquellas muestras cuyo residual dividido por el SECV del proceso supere el valor de 2,5 serán eliminadas del conjunto de calibración.

$$T = \frac{\text{residual}}{\text{SECV}}$$

Algunos de los parámetros que se obtienen de la ecuación de calibración son:

- **RSQ:** coeficiente de correlación múltiple; se utiliza para medir el grado con el que el calibrado ajusta los datos (R Squared).

$$RSQ = 1 - \left(\frac{\sum_{i=1}^N (y_{esp_i} - \hat{y}_{obs_i})^2}{\sum_{i=1}^N (\hat{y}_{obs_i} - \bar{y})^2} \right)$$

- **SEC:** error estándar de calibración (Estándar Error of Calibration).

$$SEC = \sqrt{\left(\frac{\sum_{i=1}^N (y_{esp_i} - \hat{y}_{obs_i})^2}{N - p - 1} \right)}$$

- **BIAS:** se define como la media de los residuales, siendo éstos la diferencia entre el valor del laboratorio (y_{cal_i}) y el valor predicho (\hat{y}_{teo_i}).

$$residuo, f_{ij} = (y_{esp_i} - \hat{y}_{obs_i})$$

$$BIAS = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (y_{esp_i} - \hat{y}_{obs_i})$$

- **SECV:** error estándar de validación cruzada.

$$SECV = \sqrt{\left(\frac{\sum_{i=1}^N (y_{esp_i} - \hat{y}_{obs_i} - BIAS)^2}{N-1} \right)}$$

- **Rango de aplicabilidad:** valores máximo y mínimo del parámetro de referencia para los cuales se puede utilizar la ecuación.

En estas ecuaciones, el significado de cada uno de los términos es el siguiente:

y_{esp_i} : es el valor esperado, de referencia o de laboratorio que ha sido obtenido mediante un análisis de referencia de cada una de las muestras.

\hat{y}_{obs_i} : es el valor observado, calculado o predicho con la ecuación de calibración para cada muestra (i).

\bar{y} : es la media de los datos calculados

N : es el número de muestras que pertenece al subconjunto de calibración.

p : es el número de variables latentes, factores o componentes implementados en la ecuación de calibración.

Una vez obtenido el modelo se procede a la validación interna mediante la predicción de los valores del parámetro de referencia en las mismas muestras que finalmente forman parte del modelo. Algunos de los parámetros que se utilizan para estimar la bondad del modelo son:

- **RSQ:** obtenido al realizar una regresión entre los valores de referencia y los predichos mediante espectroscopía NIR.

$$RSQ = 1 - \left(\frac{\sum_{i=1}^N (y_{esp_i} - \hat{y}_{obs_i})^2}{\sum_{i=1}^N (y_{obs_i} - \bar{y})^2} \right)$$

- **SEP:** error estándar de predicción (Standard Error of Prediction).

$$SEP = \sqrt{\left(\frac{\sum_{i=1}^N (y_{esp_i} - \hat{y}_{obs_i})^2}{N} \right)}$$

- **SEP(C)**: error corregido por el BIAS.

$$SEP(C) = \sqrt{\left(\frac{\sum_{i=1}^N (y_{esp_i} - \hat{y}_{obs_i} - BIAS)^2}{N-1}\right)}$$

En estas ecuaciones (y_{obs_i}) e (\hat{y}_{esp_i}) son respectivamente, los datos calculados y teóricos para cada una de las i-muestras y N es el número de muestras utilizadas para realizar la validación interna.

- **RPD**: capacidad de predicción del modelo (Ratio Performance Deviation). Se trata de la relación entre la Desviación Estándar (SD) de los datos obtenido mediante el análisis de referencia y el error estándar de predicción de estos.

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

Este valor idealmente debe ser superior a 2,5, si bien en los casos en los que SD_{ref} es menor que la unidad puede no llegarse a ese valor ideal (Williams et al., 1993).

Por último, para comprobar la robustez del modelo de calibración se realiza una validación externa, aplicando las ecuaciones a un conjunto de muestras que no pertenecen al colectivo de calibración, el 20% de las muestras que originalmente se separaron del conjunto. Algunos de los parámetros que se evalúan son:

- Media de los residuales.
- Porcentaje de error respecto al valor de referencia.
- RMSE: error cuadrático medio (Root Mean Standard Error).

$$RMSE = \sqrt{\left(\frac{\sum_{i=1}^N (y_{esp_i} - \hat{y}_{obs_i})^2}{N}\right)}$$

En esta ecuación (y_{esp_i}) e (\hat{y}_{obs_i}) son respectivamente, los datos calculados y teóricos para cada una de las i-muestras y N es el número de muestras utilizadas para realizar la validación externa. La fórmula es la misma que se emplea en validación interna (para el SEP), pero aplicada a muestras que no pertenecen al colectivo de calibración.

5.3. Análisis cualitativo

Los métodos de análisis cualitativos son técnicas quimiométricas basadas en Métodos de Reconocimiento de Pautas (PRM, Pattern Recognition Methods) (Massart et al., 1998). Este principio se basa en comparar cómo de similar es la muestra a analizar con otra tomada como referencia. Matemáticamente, esta comparación se realiza según criterios de correlación o distancia, determinando una función que permite llevar a cabo la combinación lineal de las

variables. Se busca minimizar la variabilidad existente entre muestras de una misma clase, lo que conlleva maximizar las diferencias existentes entre las diferentes clases a tener en cuenta (Massart et al., 1997, 1998; Næs et al., 2002).

Los PRMs se clasifican en dos grupos generales en función de que sean previamente supervisados o no supervisados (Figura 30). La diferencia entre estos grupos se basa en si se conoce o no la clase a la cual pertenece la muestra a analizar antes de ejecutar el análisis.

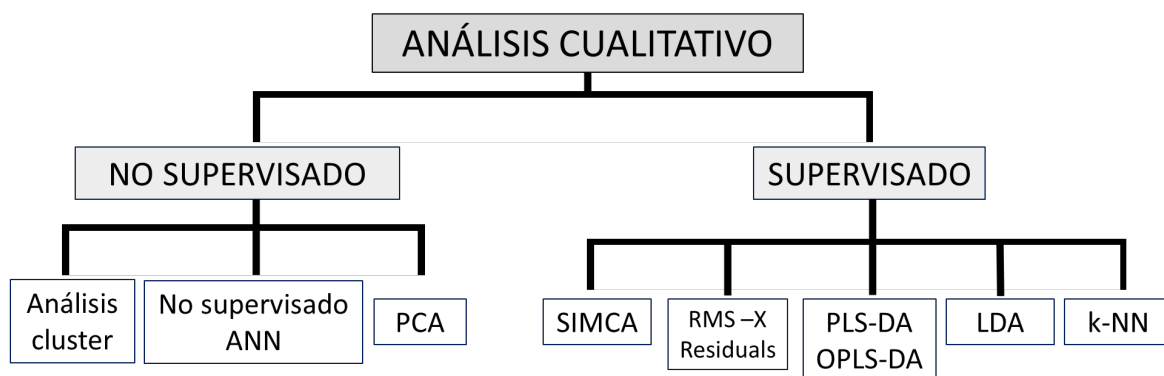


Figura 30: Clasificación general de métodos de reconocimiento de patrones supervisados.

Los métodos no supervisados emplean únicamente la comparación de semejanzas y diferencias que existen entre los espectros de un grupo de muestras. El PCA se puede incluir entre los métodos no supervisados a pesar de que no existe unanimidad entre los autores a la hora de considerar el PCA como un método de clasificación, ya que no fija fronteras entre las diferentes clases ni aplica criterios estadísticos para justificar la discriminación. Por ello se plantea como una técnica de reducción de variables y por ello se ha explicado en el apartado 5.1. de la presente memoria.

Los métodos supervisados de clasificación por clases prefijadas se basan en la creación de dominios en el espacio donde se fijan unos límites espaciales para cada una de las clases generando un modelo matemático independiente. Las muestras pueden ubicarse dentro del dominio, clasificándose como perteneciente a dicha clase o a ninguna de ellas. Para el caso de los métodos supervisados se requiere disponer de un conjunto de muestras representativos y equilibrados para cada una de las clases que se desea clasificar.

Existen diversos métodos tal y como se recoge en la figura 30. A continuación, se describen únicamente los empleados para el tratamiento de datos de la presente memoria y que fueron la discriminación por RMS-X Residuals, el análisis discriminante lineal (LDA; Linear Discriminant Analysis), el método de los vecinos más cercanos (k-NN; k-Narest Neighbor) y la proyección ortogonal sobre estructuras latentes - análisis discriminante (OPLS-DA; Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis).

- **Discriminación por RMS-X Residuals**

El método de los valores residuales RMS X se fundamenta en el análisis de los datos que no se pueden explicar mediante el modelo PCA y que se almacenan en una matriz de datos. Para trabajar con este método se parte de aplicar el PCA a los datos (espectros crudos o tratados) mediante alguno de los tratamientos matemáticos espectrales comentados en el apartado 5.1.4 de la presente memoria. Se selecciona el mejor tratamiento matemático en función de que tenga como resultado del modelo el mayor número de muestras correctamente clasificadas.

Para obtener los valores residuales RMS-X, se calcula la raíz cuadrada de la media aritmética de los cuadrados de los valores residuales de las muestras. La estadística RMS (C) se define mediante la siguiente fórmula:

$$RMS(C) = 10^6 \times \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_{ij} - y_{ik}) - \frac{(\sum_{i=1}^n (y_{ij} - y_{ik}))^2}{n}}{n - 1}}$$

Donde y_{ij} es el log (1/R) de la submuestra j para la longitud de onda i , y_{ik} es el (log 1/R) de la submuestra k para la longitud de onda i , y n es el número de longitudes de onda utilizadas.

Este método resulta útil cuando se quiere detectar en nuevos espectros una variación espectral diferente a la mostrada por el conjunto de datos espectrales del grupo de referencia (Nørgaard et al., 2014) y hace posible la categorización espectral de las muestras. Es un método desarrollado por Foss System y se aplica mediante el software específico de tratamiento espectral WinISI 4.10. Permite la clasificación de múltiples grupos dentro del conjunto muestral.

La información bibliográfica en cuanto al método y a su aplicación es escasa, sin embargo, ha dado resultados satisfactorios en la clasificación de productos acogidos a marcas de calidad (Revilla et al., 2020) y en la clasificación de harinas fortificadas (Martínez-Martín et al., 2023).

- **Método de los k vecinos más cercanos (k-Nearest Neighbours; k-NN)**

Este algoritmo es considerado uno de los mejores para la minería de datos debido a su simplicidad en comparación con otras técnicas de aprendizaje automático (Wu et al., 2008). Está basado en la clasificación de una muestra desconocida en la categoría a la que pertenecen sus k vecinos más próximos, siendo k un valor arbitrario, normalmente bajo e impar (3 o 5 para evitar empates en la clasificación).

El algoritmo k-NN forma parte del grupo de algoritmos denominados “lazy learning methods” lo que significa que no precisa de una etapa de entrenamiento previa y el cálculo se realiza en el momento de llevar a cabo la clasificación.

Para aplicar el método se hallan las distancias entre la nueva muestra y todas las muestras próximas del conjunto de calibración. El cálculo de distancias es necesario para determinar cuáles son las muestras que están más cercanas de la nueva muestra a consultar. Las métricas de distancia van a dividir los objetos en diferentes regiones según los límites de decisión. Son diversas las métricas que se pueden emplear siendo la distancia euclidiana la más utilizada

estando limitada a vectores de valor real. Se basa en la medida de una línea recta entre el objeto nuevo y otro objeto presente en el conjunto de calibración según la siguiente fórmula:

$$d(x, y) = \sqrt{\sum_{i=1}^n (y_i - x_i)^2}$$

Una vez calculadas las distancias se buscan las muestras vecinas más cercanas. Para la asignación de clases se utiliza un sistema de puntos ponderados o “votos de distinta calidad”. Cada objeto vecino más cercano vota por su clase y la clase con más votos se toma como clase asignada para la clasificación (Figura 31).

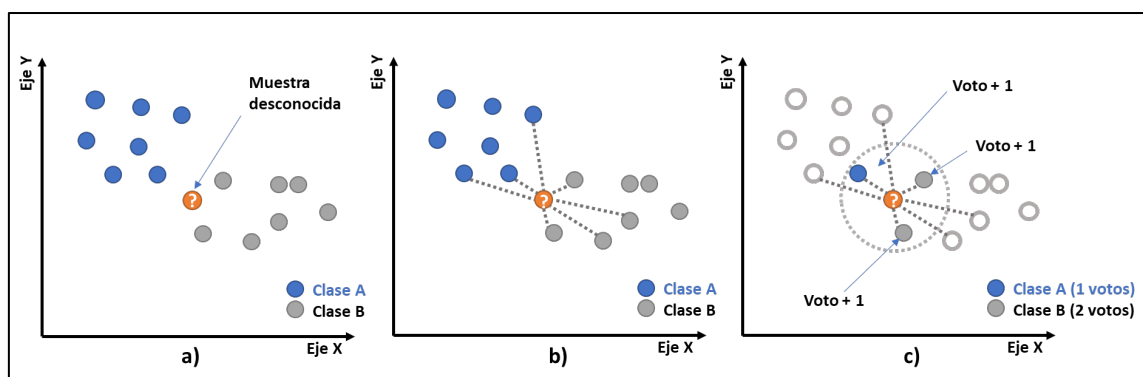


Figura 31: Pasos básicos para el algoritmo k-NN. a) cálculo de distancias. b) localizar los vecinos más cercanos. c) votar por las etiquetas. (Fuente: www.ibm.com/co-es/topics/knn).

El mayor inconveniente del método KNN respecto al análisis discriminante es que no calcula las probabilidades de pertenencia del objeto nuevo a cada categoría. Las ventajas de este método es que establece fronteras irregulares entre las clases pudiendo clasificar objetos, aunque las clases no sean linealmente ni cuadráticamente separables.

Este algoritmo se ha empleado en el presente trabajo junto con el análisis PCA-LDA como último paso para clasificar las muestras en función de su clase a partir de la huella digital espectral obtenida de la técnica analítica GC-IMS. La combinación de estos algoritmos ha mostrado ser eficaz en diversos estudios para clasificación de aceites y grasas animales (Alonso et al., 2008; Arroyo-Manzanares et al., 2018; Contreras et al., 2019; Garrido-Delgado et al., 2018). También muestra potencial para la interpretación de espectros NIRS en el ámbito agroalimentario (Kaufmann et al., 2022; Millet et al., 2005; Ramírez-Morales et al., 2021).

▪ Análisis Discriminante Lineal

El Análisis Discriminante Lineal (LDA) es un método común para la clasificación de datos (Jombart et al., 2010) siendo el método de clasificación más popular para la detección de adulteraciones en el análisis de alimentos (Esteki et al., 2018). Al igual que el PCA, el LDA podría considerarse como un método de reducción de variables ya que ambos métodos representan puntos de mayor dimensión en un plano de menor dimensión (Tharwat et al., 2017). Para ello, utiliza un algoritmo que busca combinaciones lineales de las variables originales que maximizan la varianza entre clases, a la vez que minimizan la varianza inter-clases (Bylesjö et al., 2006). El

objetivo es tratar de encontrar la mejor combinación lineal que separe al máximo el número de clases categóricas asignadas a las muestras presentes.

Las funciones discriminantes se construyen de una en una, buscando las direcciones del espacio que hacen máxima la expresión:

$$\lambda = \text{SCD}/\text{SC1}$$

Donde:

SCD: suma de los cuadrados de las distancias Euclídeas entre los objetos que pertenecen a distintas clases, en la dirección que indica la función discriminante.

SC1: suma de los cuadrados de las distancias Euclídeas entre los objetos que pertenecen a la misma clase, también en la dirección de la función discriminante.

Así es posible establecer fronteras explícitas que separan las regiones del espacio que pertenecen a cada categoría. La clasificación de los objetos se hace en función de sus probabilidades de pertenencia a una u otra clase según el teorema de Bayes. LDA estima la probabilidad de observación de los valores de los predictores a que pertenezca a una clase u otra de las que se dispone en la variable cualitativa. Finalmente asigna la observación a la clase para la cual disponga de una probabilidad predicha mayor. La región crítica que separa dos clases es una recta, o un plano o hiperplano, donde se igualan las probabilidades de pertenencia a una u otra clase, esta línea recta o plano es perpendicular a la función encontrada (Figura 32).

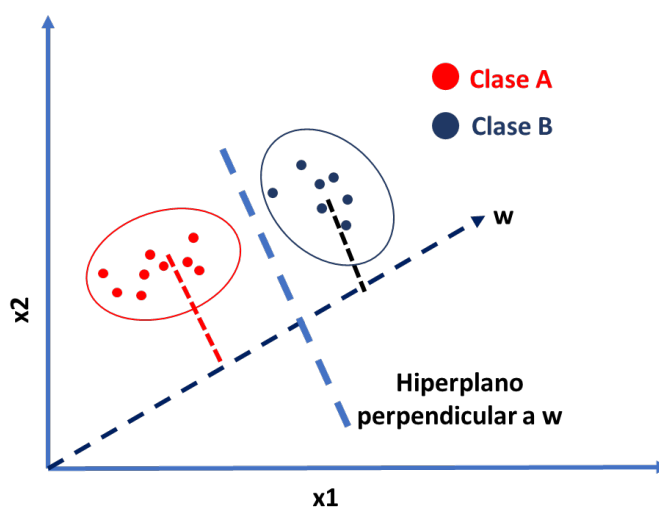


Figura 32: Análisis Discriminante Lineal (LDA). Separación entre clases.

Este análisis cualitativo es ampliamente utilizado en análisis de compuestos orgánicos volátiles mediante GC-IMS (Contreras et al., 2019; Garrido-Delgado et al., 2012; Gerhardt et al., 2019). Esta estrategia de clasificación permite trabajar con matrices de datos de mayores dimensiones que con otros métodos y permite obtener mejores porcentajes de clasificación (Arroyo-Manzanares et al., 2018; Contreras et al., 2019).

Su aplicación a los resultados procedentes del GC-IMS ha resultado ser eficaz en diversos estudios con el fin de clasificar diferentes categorías de aceites para detectar adulteraciones

(Contreras et al., 2019; Garrido-Delgado et al., 2018), clasificación de muestras de jamón según el etiquetado (Arroyo-Manzanares et al., 2018) así como es grasa de cerdo ibérico subcutánea (Alonso et al., 2008). También son diversos los estudios que aplican este análisis cualitativo en combinación con la espectroscopía NIR en el ámbito agroalimentario (Carvalho et al., 2018; Nobari Moghaddam et al., 2022; Qi et al., 2022).

▪ Proyección Ortogonal sobre Estructuras Latentes – Análisis Discriminante

Este análisis está basado en la Proyección sobre Estructuras Latentes Ortogonales (OPLS) y deriva de la proyección sobre estructuras latentes (PLS) con una mejora en cuanto a la interpretación cuando hay gran cantidad de datos multivariantes (Bylesjö et al., 2006). La capacidad predictiva se mantiene para ambas proyecciones.

El objetivo del PLS y por lo tanto del OPLS es encontrar las relaciones entre un conjunto de datos X y una variable “ y ”. El procedimiento consiste en encontrar las direcciones en el espacio que maximicen la covarianza entre las variables latentes del conjunto de datos X y la variable “ y ” (Figura 33). Estas direcciones (componentes) dan lugar a un nuevo hiperplano donde se proyectan las variables. Para la descomposición de la matriz X para el PLS, la primera componente se calcula como una variable latente que tenga la máxima covarianza entre los *scores* y la variable “ y ”. Posteriormente la información de esa componente se resta de la matriz de datos X y a partir de la matriz residual X , se calcula la siguiente componente al igual que se calculó el primero. El procedimiento se repite hasta que no se obtenga ninguna mejora en el modelado de la variable y a partir de la matriz X (Varmuza y Filzmoser, 2009).

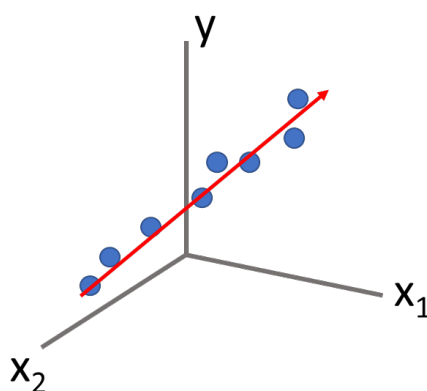


Figura 33: Primer componente del PLS. La dirección que toma es aquella que maximiza la covarianza entre la matriz X y la variable “ y ”. (Fuente: Zubiri Gaitán, 2018).

El método OPLS lo desarrollaron Trygg y Wold (2002) y tiene utilizada para centrar la información correlacionada en una componente predictiva mientras que la información no correlacionada se almacena en las componentes ortogonales. Para ello, utiliza la información de la variable “ y ” para descomponer la matriz X en dos bloques, uno que contiene la información correlacionada (variación predictiva) y otro de información no correlacionada a “ y ” (ortogonal) (Bylesjö et al., 2006).

En estos análisis discriminantes el objetivo es clasificar el conjunto de datos \mathbf{X} en dos o más clases. Para ello, tenemos un vector “ y ” compuesto de 1 y 0, que clasificará las observaciones por grupos. La dirección de las componentes serán las que logren la mayor separación de las medias, teniendo en cuenta la variabilidad (Figura 34).

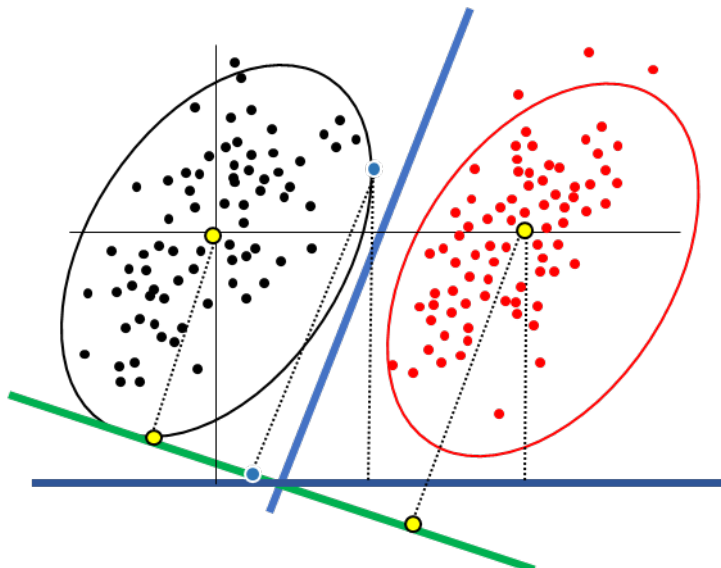


Figura 34: Discriminación en dos grupos (puntos rojos y negros). La recta verde representa la dirección que mayor separación logra. Los puntos amarillos en el centro de las elipses representan la media. (Fuente: Reproducido de Zubiri Gaitán, 2018).

El OPLS - DA presenta la ventaja de que es más sencillo de interpretar y permite analizar la información que almacena la componente predictiva de manera independiente a las componentes ortogonales que describen la variación (Westerhuis et al., 2010). Esto permite separar las variables consideradas relevantes para la discriminación de las que generan ruido y variabilidad no correlacionada (Kalogiouri et al., 2020).

El uso de herramientas de clasificación supervisada como es la proyección OPLS-DA combinada con metodologías de alta resolución de espectrometría de masas o GC-IMS es aplicada de forma habitual en estudios de autenticidad de alimentos (Contreras et al., 2019; Kalogiouri et al., 2020). Este método de clasificación ha sido ampliamente utilizado para clasificar aceites y grasas mediante huellas dactilares dirigidas, basado en seleccionar un número determinado de señales pertenecientes a compuestos orgánicos volátiles mediante GC-IMS (Contreras et al., 2019, 2020; Kalogiouri et al., 2020; Martín-Gómez et al., 2019). También resulta útil para discriminar matrices de datos resultantes de la espectroscopía NIR con el fin de detectar adulteraciones o autenticar productos agroalimentarios (Balbino et al., 2022; Daneshvar et al., 2015; Revilla et al., 2020; Srinuttrakul et al., 2021)

IV. BIBLIOGRAFÍA / BIBLIOGRAPHY

BIBLIOGRAFÍA / BIBLIOGRAPHY

- Agelet, L. E., y Hurburgh, C. R. (2010). A Tutorial on Near Infrared Spectroscopy and Its Calibration. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 40(4), 246-260. <https://doi.org/10.1080/10408347.2010.515468>
- Alfaia, C. M., Lopes, P. A., Madeira, M. S., Pestana, J. M., Coelho, D., Toldrá, F., y Prates, J. A. M. (2019). Chapter Two—Current feeding strategies to improve pork intramuscular fat content and its nutritional quality. En F. Toldrá (Ed.), *Advances in Food and Nutrition Research* (Vol. 89, pp. 53-94). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2019.03.006>
- Allee, G. L., O'hea, E. K., Leveille, G. A., y Baker, D. H. (1971). Influence of Dietary Protein and Fat on Lipogenesis and Enzymatic Activity in Pig Adipose Tissue. *The Journal of Nutrition*, 101(7), 869-878. <https://doi.org/10.1093/jn/101.7.869>
- Alonso, R., Rodríguez-Estévez, V., Domínguez-Vidal, A., Ayora-Cañada, M. J., Arce, L., y Valcárcel, M. (2008). Ion mobility spectrometry of volatile compounds from Iberian pig fat for fast feeding regime authentication. *Talanta*, 76(3), 591-596. Scopus. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.03.052>
- Alves, E., Óvilo, C., Rodríguez, M. C., y Silió, L. (2003). Mitochondrial DNA sequence variation and phylogenetic relationships among Iberian pigs and other domestic and wild pig populations. *Animal Genetics*, 34(5), 319-324. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2052.2003.01010.x>
- Andrada, A. D. (2006). Alimentación del cerdo en las fases de crecimiento y acabado (y II). *MG Mundo ganadero*, 17(189), 62-65.
- Andrés, A. I., Cava, R., Mayoral, A. I., Tejeda, J. F., Morcuende, D., y Ruiz, J. (2001). Oxidative stability and fatty acid composition of pig muscles as affected by rearing system, crossbreeding and metabolic type of muscle fibre. *Meat Science*, 59(1), 39-47. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(01\)00050-X](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(01)00050-X)
- Andrés, A. I., Cava, R., Ventanas, J., Thovar, V., y Ruiz, J. (2004). Sensory characteristics of Iberian ham: Influence of salt content and processing conditions. *Meat Science*, 68(1), 45-51. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2003.08.019>
- Andretta, I., Pomar, C., Rivest, J., Pomar, J., Lovatto, P. A., y Radünz Neto, J. (2014). The impact of feeding growing-finishing pigs with daily tailored diets using precision feeding techniques on animal performance, nutrient utilization, and body and carcass composition1. *Journal of Animal Science*, 92(9), 3925-3936. <https://doi.org/10.2527/jas.2014-7643>
- AOAC. (1984). Official method 28.023: iodine value of edible oils and fats according to Wijs. Official methods of analysis. AOAC International, Gaithersburg, Maryland, USA.
- AOAC. (1990). Official method 920.157: melting point of fats and fatty acids capillary tube method. Official methods of analysis. AOAC International, Gaithersburg, Maryland, USA.
- AOAC. (1999). Official method 962.22: methyl esters of fatty acids in oils and fats. Official methods of analysis. AOAC International, Gaithersburg, Maryland, USA.
- Aparicio, J. B. (1987). El cerdo ibérico. *Premio de investigación editado por Sánchez Romero Carvajal Jabugo SA Huelva*, 122.
- Arce, L., Domínguez-Vidal, A., Rodríguez-Estévez, V., López-Vidal, S., Ayora-Cañada, M. J., y Valcárcel, M. (2009). Feasibility study on the use of infrared spectroscopy for the direct authentication of Iberian pig fattening diet. *Analytica Chimica Acta*, 636(2), 183-189. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.01.058>
- Armenta, S., Alcalá, M., y Blanco, M. (2011). A review of recent, unconventional applications of ion mobility spectrometry (IMS). *Analytica Chimica Acta*, 703(2), 114-123. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.07.021>

- Arroyo-Manzanares, N., Martín-Gómez, A., Jurado-Campos, N., Garrido-Delgado, R., Arce, C., y Arce, L. (2018). Target vs spectral fingerprint data analysis of Iberian ham samples for avoiding labelling fraud using headspace – gas chromatography–ion mobility spectrometry. *Food Chemistry*, 246, 65-73. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.008>
- ASICI (2022). Datos de los registros del sistema de trazabilidad de la Norma de Calidad. https://www.iberico.com/norma_calidad.php
- Ávila, M. M., Durán, M. L., Antequera, T., Palacios, R., y Luquero, M. (2007). 3D Reconstruction on MRI to Analyse Marbling and Fat Level in Iberian Loin. En J. Martí, J. M. Benedí, A. M. Mendonça, y J. Serrat (Eds.), *Pattern Recognition and Image Analysis* (pp. 145-152). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-540-72847-4_20
- Ayuso, D., González, A., Hernández, F., Corral, J. M., y Izquierdo, M. (2013). Prediction of carcass composition, ham and foreleg weights, and lean meat yields of Iberian pigs using ultrasound measurements in live animals1. *Journal of Animal Science*, 91(4), 1884-1892. <https://doi.org/10.2527/jas.2012-5357>
- Ayuso, D., González, A., Hernández, F., Peña, F., y Izquierdo, M. (2014). Effect of sex and final fattening on ultrasound and carcass traits in Iberian pigs. *Meat Science*, 96(1), 562-567. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.08.018>
- Ayuso, D., Gonzalez, A., Pena, F., y Izquierdo, M. (2018). Changes in adipose cells of Longissimus dorsi muscle in Iberian pigs raised under extensive conditions. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 90, 247-253.
- Ayuso, D., González, A., Peña, F., Hernández-García, F. I., y Izquierdo, M. (2020). Effect of Fattening Period Length on Intramuscular and Subcutaneous Fatty Acid Profiles in Iberian Pigs Finished in the Montanera Sustainable System. *Sustainability*, 12(19), Art. 19. <https://doi.org/10.3390/su12197937>
- Baca Bocanegra, B. (2019). *Aplicación de técnicas espectroscópicas vibracionales al estudio de la extractabilidad de compuestos fenólicos procedentes de subproductos enológicos*. [Tesis Doctoral, Universidad de Sevilla] <https://idus.us.es/handle/11441/82208>
- Balabin, R. M., Safieva, R. Z., y Lomakina, E. I. (2007). Comparison of linear and nonlinear calibration models based on near infrared (NIR) spectroscopy data for gasoline properties prediction. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 88(2), 183-188. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2007.04.006>
- Balage, J. M., da Luz e Silva, S., Gomide, C. A., Bonin, M. de N., y Figueira, A. C. (2015). Predicting pork quality using Vis/NIR spectroscopy. *Meat Science*, 108, 37-43. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2015.04.018>
- Balbino, S., Vincek, D., Trtanj, I., Egredija, D., Gajdoš-Kljusurić, J., Kraljić, K., Obranović, M., y Škevin, D. (2022). Assessment of Pumpkin Seed Oil Adulteration Supported by Multivariate Analysis: Comparison of GC-MS, Colourimetry and NIR Spectroscopy Data. *Foods*, 11(6), Art. 6. <https://doi.org/10.3390/foods11060835>
- Ballin, N. Z. (2010). Authentication of meat and meat products. *Meat Science*, 86(3), 577-587. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.06.001>
- Barba, C., Delgado, J. V., Sereno, R. B. S., Diéguez, E., y Cañuelo, P. (2000). Caracterización productiva de las variedades del cerdo ibérico. I: estudio preliminar de los pesos y crecimientos en premontanera y montanera. *Archivos de zootecnia*, 49, 179-187.
- Barbut, S., Sosnicki, A. A., Lonergan, S. M., Knapp, T., Ciobanu, D. C., Gatcliffe, L. J., Huff-Lonergan, E., y Wilson, E. W. (2008). Progress in reducing the pale, soft and exudative (PSE) problem in pork and poultry meat. *Meat Science*, 79(1), 46-63. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.07.031>

- Barnes, R., Dhanoa, M. S., y Lister, S. J. (1989). Standard normal variate transformation and detrending of near-infrared diffuse reflectance spectra. *Applied spectroscopy*, 43(5), 772-777.
- Baumbach, J. I., Sielemann, S., Xie, Z., y Schmidt, H. (2003). Detection of the Gasoline Components Methyl tert-Butyl Ether, Benzene, Toluene, and m-Xylene Using Ion Mobility Spectrometers with a Radioactive and UV Ionization Source. *Analytical Chemistry*, 75(6), 1483-1490. <https://doi.org/10.1021/ac020342i>
- Baumbach, J. I., y Westhoff, M. (2006). Ion mobility spectrometry to detect lung cancer and airway infections. *Spectroscopy Europe*, 18(6), 22-27.
- Bayés-García, L., Colomer-Llobart, E., Aguilar-Jiménez, M., y Calvet, T. (2021). Polymorphic fingerprint as an approach to authenticate Iberian pig categories. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 98(11), 1093-1105. <https://doi.org/10.1002/aocs.12543>
- Bayés-García, L., Tres, A., Vichi, S., Calvet, T., Cuevas-Diarte, M. A., Codony, R., Boatella, J., Caixach, J., Ueno, S., y Guardiola, F. (2016). Authentication of Iberian dry-cured ham: New approaches by polymorphic fingerprint and ultrahigh resolution mass spectrometry. *Food Control*, 60, 370-377. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.07.047>
- Beebe, K. R., Pell, R. J., y Seasholtz, M. B. (1998). *Chemometrics: A practical guide* (Vol. 4). Wiley New York.
- Bejarano, S. M. (2001). *Enciclopedia de la carne y de los productos cárnicos*. Ediciones Martín y Macías.
- Ben-Gera, I., y Norris, K. H. (1968). Direct Spectrophotometric Determination of Fat and Moisture in Meat Products. *Journal of Food Science*, 33(1), 64-67. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1968.tb00885.x>
- Benítez, R., Trakooljul, N., Núñez, Y., Isabel, B., Murani, E., De Mercado, E., Gómez-Izquierdo, E., García-Casco, J., López-Bote, C., Wimmers, K., y Óvilo, C. (2019). Breed, Diet, and Interaction Effects on Adipose Tissue Transcriptome in Iberian and Duroc Pigs Fed Different Energy Sources. *Genes*, 10(8), Art. 8. <https://doi.org/10.3390/genes10080589>
- Benito Bernáldez, M. J., Ferrera, J. L., Lara, E., Oreja, L. P., y Casco, J. M. G. (2001). Caracteres productivos y de calidad en cerdos ibéricos puros y cruzados con Duroc: Influencia de la montanera sobre su perfil de ácidos grasos. *Sólo Cerdo Ibérico*, 7 (OCT), 7-18.
- Bertrand, D., y Dufour, E. (2000). *La spectroscopie infrarouge et ses applications analytiques* (TECyDOC, p. 660 p.). Lavoisier. <https://hal.inrae.fr/hal-02824683>
- Birth, G. S., y Norris, K. H. (1958). An instrument using light transmittance for nondestructive measurement of fruit maturity. *Food Technology*, 12(11), 592-595.
- Blaitt, R. M. N. A., Lo Tierzo, V., Denadai, J. C., Kruliski, C. R. de S., Ducatti, C., Berto, D. A., y Sartori, M. M. P. (2021). Isotopic carbon turnover in pig hoof and rib. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, 43. <https://doi.org/10.4025/actascianimsci.v43i1.48299>
- Blanco, M., y Alcalá, M. (2005). Use of near-infrared spectroscopy for off-line measurements in the pharmaceutical industry. *Process Analytical Technology: Spectroscopic Tools and Implementation Strategies for the Chemical and Pharmaceutical Industries*, 362-391.
- Blanco, M., y Villarroya, I. (2002). NIR spectroscopy: A rapid-response analytical tool. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 21(4), 240-250. [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(02\)00404-1](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(02)00404-1)
- Böcker, S., Letzel, M. C., Lipták, Z., y Pervukhin, A. (2009). SIRIUS: Decomposing isotope patterns for metabolite identification†. *Bioinformatics*, 25(2), 218-224. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn603>
- BOE (1988). Orden de 7 de noviembre de 1988 por la que se homologa el contrato-tipo de compraventa de cerdos ibéricos y sus cruces, con destino a su sacrificio y elaboración, para la campaña 1988-89. BOE nº 268.

- Bonneau, M., y Lebret, B. (2010). Production systems and influence on eating quality of pork. *Meat Science*, 84(2), 293-300. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2009.03.013>
- Bonneau, M., Walstra, P., Claudi-Magnussen, C., Kempster, A. J., Tornberg, E., Fischer, K., Diestre, A., Siret, F., Chevillon, P., Claus, R., Dijksterhuis, G., Punter, P., Matthews, K. R., Agerhem, H., Béague, M. P., Oliver, M. A., Gispert, M., Weiler, U., von Seth, G., ... Cook, G. L. (2000). An international study on the importance of androstenone and skatole for boar taint: IV. Simulation studies on consumer dissatisfaction with entire male pork and the effect of sorting carcasses on the slaughter line, main conclusions and recommendations. *Meat Science*, 54(3), 285-295. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(99\)00105-9](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(99)00105-9)
- Bosch, L., Tor, M., Reixach, J., y Estany, J. (2012). Age-related changes in intramuscular and subcutaneous fat content and fatty acid composition in growing pigs using longitudinal data. *Meat Science*, 91(3), 358-363. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.02.019>
- Bota, G. M., y Harrington, P. B. (2006). Direct detection of trimethylamine in meat food products using ion mobility spectrometry. *Talanta*, 68(3), 629-635. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2005.05.001>
- Brereton, R. G. (2003). *Chemometrics: Data analysis for the laboratory and chemical plant*. Chichester, West Sussex, England: J. Wiley. Wiley.
- Brøndum, J., Munck, L., Henckel, P., Karlsson, A., Tornberg, E., y Engelsen, S. B. (2000). Prediction of water-holding capacity and composition of porcine meat by comparative spectroscopy. *Meat Science*, 55(2), 177-185. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(99\)00141-2](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(99)00141-2)
- Burns, D. A., y Ciurczak, E. W. (1992). *Handbook of near-infrared analysis*. Marcel Dekker.
- Buxadé, C. I. (1984). *Ganado porcino, sistemas de explotación y técnicas de producción*. Mundi Prens.
- Bylesjö, M., Rantalainen, M., Cloarec, O., Nicholson, J. K., Holmes, E., y Trygg, J. (2006). OPLS discriminant analysis: Combining the strengths of PLS-DA and SIMCA classification. *Journal of Chemometrics*, 20(8-10), 341-351. <https://doi.org/10.1002/cem.1006>
- Caballero, D., Caro, A., Rodríguez, P. G., Durán, M. L., Ávila, M. del M., Palacios, R., Antequera, T., y Pérez-Palacios, T. (2016). Modeling salt diffusion in Iberian ham by applying MRI and data mining. *Journal of Food Engineering*, 189, 115-122. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2016.06.003>
- Cáceres-Navado, J. M., Garrido-Varo, A., De Pedro-Sanz, E., y Pérez-Marín, D. C. (2019). Fourier transform near-infrared spectroscopy coupled to a long fibre optic head for the quality control of IBERIAN pork loins: Intact versus minced. *Meat Science*, 153, 86-93. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2019.03.008>
- Čandek-Potokar, M., Prevolnik, M., y Škrlep, M. (2006). Ability of near Infrared Spectroscopy to Predict Pork Technological Traits. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 14(4), 269-277. <https://doi.org/10.1255/jnirs.644>
- Carrapiso, A. I., Bonilla, F., y García, C. (2003). Effect of crossbreeding and rearing system on sensory characteristics of Iberian ham. *Meat Science*, 65(1), 623-629. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(02\)00256-5](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(02)00256-5)
- Carrapiso, A. I., y García, C. (2005). Instrumental colour of Iberian ham subcutaneous fat and lean (biceps femoris): Influence of crossbreeding and rearing system. *Meat Science*, 71(2), 284-290. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2005.03.024>
- Carvalho, L. C., Morais, C. L. M., Lima, K. M. G., Leite, G. W. P., Oliveira, G. S., Casagrande, I. P., Santos Neto, J. P., y Teixeira, G. H. A. (2018). Using Intact Nuts and Near Infrared Spectroscopy to Classify Macadamia Cultivars. *Food Analytical Methods*, 11(7), 1857-1866. <https://doi.org/10.1007/s12161-017-1078-9>

- Casillas, M. (1995). *Metodologías de caracterización de la grasa de cerdo Ibérico para el control de calidad de sus productos*. Universidad de Córdoba.
- Cava, R., y Andrés, A. (2001). La obtención de materia prima de una adecuada aptitud tecnológica. Características de la grasa determinantes de la calidad del jamón: Influencia de los factores genéticos y ambientales. En *Tecnología del jamón Ibérico* (pp. 99-129). Mundi-Prensa.
- Cava, R., Andrés, A., Ruiz, J., Tejada, J., y Ventanas, J. (1999). Influencia de la alimentación sobre el perfil de ácidos grasos. *Libro de ponencias presentadas en las I Jornadas sobre el cerdo Ibérico y sus productos, Salamanca-Guijuelo*, 22, 126-134.
- Cava, R., Ruiz, J., López-Bote, C., Martín, L., García, C., Ventanas, J., y Antequera, T. (1997). Influence of finishing diet on fatty acid profiles of intramuscular lipids, triglycerides and phospholipids in muscles of the Iberian pig. *Meat Science*, 45(2), 263-270. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(96\)00102-7](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(96)00102-7)
- Cava, R., Ventanas, J., Ruiz, J., Andrés, A. I., y Antequera, T. (2000). Sensory characteristics of Iberian ham: Influence of rearing system and muscle location/ Características sensoriales del jamón Ibérico: Influencia del sistema de engorde y del músculo. *Food Science and Technology International*, 6(3), 235-242. <https://doi.org/10.1177/108201320000600306>
- Cerling, T. E., Harris, J. M., MacFadden, B. J., Leakey, M. G., Quade, J., Eisenmann, V., y Ehleringer, J. R. (1997). Global vegetation change through the Miocene/Pliocene boundary. *Nature*, 389(6647), Art. 6647. <https://doi.org/10.1038/38229>
- Cernadas, E., Antequera, T., Rodríguez, P. G., Duran, M. L., Gallardo, R., y Villa, D. (2001). Magnetic resonance imaging to classify loin from Iberian pig. *SPECIAL PUBLICATION-ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY*, 262, 239-245.
- Cernadas, E., Carrión, P., Rodríguez, P. G., Muriel, E., y Antequera, T. (2005). Analyzing magnetic resonance images of Iberian pork loin to predict its sensorial characteristics. *Computer Vision and Image Understanding*, 98(2), 344-360. <https://doi.org/10.1016/j.cviu.2004.08.004>
- Cernadas, E., Durán, M. L., y Antequera, T. (2002). Recognizing marbling in dry-cured Iberian ham by multiscale analysis. *Pattern Recognition Letters*, 23(11), 1311-1321. [https://doi.org/10.1016/S0167-8655\(02\)00080-6](https://doi.org/10.1016/S0167-8655(02)00080-6)
- Chang, C.-W., Laird, D. A., Mausbach, M. J., y Hurburgh, C. R. (2001). Near-Infrared Reflectance Spectroscopy—Principal Components Regression Analyses of Soil Properties. *Soil Science Society of America Journal*, 65(2), 480-490. <https://doi.org/10.2136/sssaj2001.652480x>
- Cisneros, F., Ellis, M., McKeith, F. K., McCaw, J., y Fernando, R. L. (1996). Influence of slaughter weight on growth and carcass characteristics, commercial cutting and curing yields, and meat quality of barrows and gilts from two genotypes. *Journal of Animal Science*, 74(5), 925-933. <https://doi.org/10.2527/1996.745925x>
- Clemente, I., Azor, P., Membrillo, A., Jiménez, A., Santos, E., Diéguez, E., y Dorado, G. (2008). El Cerdo Ibérico: Una agrupación racial caracterizada por su elevada diversidad genética. *Solo Cerdo Ibérico*, 19, 21-28.
- Contreras, M. del M., Aparicio, L., y Arce, L. (2020). Usefulness of GC-IMS for rapid quantitative analysis without sample treatment: Focus on ethanol, one of the potential classification markers of olive oils. *LWT*, 120, 108897. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108897>
- Contreras, M. del M., Jurado-Campos, N., Arce, L., y Arroyo-Manzanares, N. (2019). A robustness study of calibration models for olive oil classification: Targeted and non-targeted fingerprint approaches based on GC-IMS. *Food Chemistry*, 288, 315-324. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.02.104>

- Daneshvar, A., Tigabu, M., Karimidoost, A., y Oden, P. C. (2015). Single seed Near Infrared Spectroscopy discriminates viable and non-viable seeds of *Juniperus polycarpus*. *Silva Fennica*, 49(5). <https://www.silvafennica.fi/article/1334/author/4068>
- Daza, A. (2001). *Sistemas de explotación*. En: *Porcino Ibérico: Aspectos claves* (Mundi Prensa).
- Daza, A., Esteban, M., Mercado, E. de, y Gomez, E. (2010). Short communication. Effect of housing system during the finishing period on growth performance and quality fat of Iberian pigs. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 8(4), Art. 4. <https://doi.org/10.5424/sjar/2010084-1391>
- Daza, A., Lopez-Bote, C. J., Olivares, A., Menoyo, D., y Ruiz, J. (2007). Age at the beginning of the fattening period of Iberian pigs under free-range conditions affects growth, carcass characteristics and the fatty acid profile of lipids. *Animal Feed Science and Technology*, 139(1), 81-91. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2007.01.003>
- Daza, A., López-Bote, C., Rey, A., y Olivares, Á. (2006). Effect of age at the beginning of the free-range fattening period on growth and carcass and fat quality in Iberian pigs. *Archives of Animal Nutrition*, 60(4), 317-324. <https://doi.org/10.1080/17450390600785285>
- Daza, A., Mateos, A., López Carrasco, C., Rey, A., Ovejero, I., y López-Bote, C. J. (2006). Effect of feeding system on the growth and carcass characteristics of Iberian pigs, and the use of ultrasound to estimate yields of joints. *Meat Science*, 72(1), 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2005.04.031>
- Daza, A., Mateos, A., Rey, A. I., Ovejero, I., y López-Bote, C. J. (2007). Effect of duration of feeding under free-range conditions on production results and carcass and fat quality in Iberian pigs. *Meat Science*, 76(3), 411-416. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2006.10.004>
- Daza, A., Menoyo, D., y López Bote, C. J. (2009). Carcass Traits and Fatty Acid Composition of Subcutaneous, Intramuscular and Liver Fat from Iberian Pigs Fed in Confinement only with Acorns or a Formulated Diet. *Food Science and Technology International*, 15(6), 563-569. <https://doi.org/10.1177/1082013209352928>
- Daza, A., Menoyo, D., Olivares, A., Cordero, G., y López-Bote, C. (2007). Effect of Iberian pig feeding system on tissue fatty-acid composition and backfat rheological properties. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 16(3), 408.
- Daza, A., Rey, A. I., Ruiz, J., y Lopez-Bote, C. J. (2005). Effects of feeding in free-range conditions or in confinement with different dietary MUFA/PUFA ratios and α -tocopheryl acetate, on antioxidants accumulation and oxidative stability in Iberian pigs. *Meat Science*, 69(1), 151-163. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2004.06.017>
- de Miguel, Á., Hoekstra, A. Y., y García-Calvo, E. (2015). Sustainability of the water footprint of the Spanish pork industry. *Ecological Indicators*, 57, 465-474. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2015.05.023>
- De Pedro, E., Garrido, A., Bares, I., Casillas, M., y Murray, I. (1992). Application of near infrared spectroscopy for quality control of Iberian pork industry. *Near Infrared Spectroscopy*, 345-348.
- De Pedro, E., Garrido, A., Lobo, A., Dardenne, P., y Murray, I. (1995). Objective classification of Iberian pig carcasses: GC versus NIR. *Leaping ahead with near infrared spectroscopy*, 291-295.
- Deane, J. M. (1992). Data reduction using principal components analysis. En *Data Handling in Science and Technology* (Vol. 9, pp. 125-177). Elsevier.
- Decker, E. A., Faustman, C., y Lopez-Bote, C. J. (2000). *Antioxidants in Muscle Foods: Nutritional Strategies to Improve Quality*. John Wiley y Sons.
- Delgado Huertas, A., De Pedro Sanz, E., García Olmo, J., y Reyes, E. (2007). *15N/14N ratio and quality control of Iberian pig carcasses* (Vol. 76). Options Méditerranéennes Série A.
- Den Herder, M., Moreno, G., Mosquera-Losada, R. M., Palma, J. H. N., Sidiropoulou, A., Santiago Freijanes, J. J., Crous-Duran, J., Paulo, J. A., Tomé, M., Pantera, A., Papanastasis, V. P.,

- Mantzanas, K., Pachana, P., Papadopoulos, A., Plieninger, T., y Burgess, P. J. (2017). Current extent and stratification of agroforestry in the European Union. *Agriculture, Ecosystems y Environment*, 241, 121-132. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2017.03.005>
- DeThomas, F., y Brimmer, P. (2002). Monochromators for Near-infrared Spectroscopy. In J. Chalmers, y P. Griffiths. En J. Chalmers y P. Griffiths (Eds.), *Handbook of Vibrational Spectroscopy*. John Wiley y Sons Ltd.
- Díaz, I., Regueiro, J. A. G., Casillas, M., y De Pedro, E. (1996). Triglyceride composition of fresh ham fat from Iberian pigs produced with different systems of animal nutrition. *Food Chemistry*, 55(4), 383-387. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(95\)00140-9](https://doi.org/10.1016/0308-8146(95)00140-9)
- Díaz-Caro, C., García-Torres, S., Elghannam, A., Tejerina, D., Mesias, F. J., y Ortiz, A. (2019). Is production system a relevant attribute in consumers' food preferences? The case of Iberian dry-cured ham in Spain. *Meat Science*, 158, 107908. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2019.107908>
- Dobao, M. T., Rodriganez, J., Silio, L., Toro, M., De Pedro, E., y Garcia de Siles, J. (1987). Crecimiento y características de canal en cerdos Ibéricos, Duroc-Jersey x Ibérico y Jiaying x Ibérico. *Invest Agr: Prod San Anim*, 2(1), 9-23.
- Dransfield, E., Ngapo, T. M., Nielsen, N. A., Bredahl, L., Sjødén, P. O., Magnusson, M., Campo, M. M., y Nute, G. R. (2005). Consumer choice and suggested price for pork as influenced by its appearance, taste and information concerning country of origin and organic pig production. *Meat Science*, 69(1), 61-70. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2004.06.006>
- Eiceman, G. A., y Karpas, Z. (2005). *Ion Mobility Spectrometry* (2nd ed.). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781420038972>
- Ellis, M. (1993). Factors affecting the eating quality of pork. *Growth of Pig*.
- Espárrago Carande, F. D. (1998). Estudio comparativo de calidad, rendimiento y costes entre cerdos ibéricos puros y cruzados engordados en régimen de montanera. *Sólo Cerdo Ibérico*, 1 (OCT), 108-118.
- Espárrago, F., Cabeza de Vaca, F., Molina, M., y Guijarro, J. (2001). La industria del cerdo Ibérico. *Porcino Ibérico: aspectos claves (Buxadé and A. Daza, coord.)*. Ed Mundi Prensa, Madrid, 535-588.
- Essén-Gustavsson, B., Karlsson, A., Lundström, K., y Enfält, A.-C. (1994). Intramuscular fat and muscle fibre lipid contents in halothane-gene-free pigs fed high or low protein diets and its relation to meat quality. *Meat Science*, 38(2), 269-277. [https://doi.org/10.1016/0309-1740\(94\)90116-3](https://doi.org/10.1016/0309-1740(94)90116-3)
- Esteki, M., Shahsavari, Z., y Simal-Gandara, J. (2018). Use of spectroscopic methods in combination with linear discriminant analysis for authentication of food products. *Food Control*, 91, 100-112. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.03.031>
- Estévez, M., Morcuende, D., y Cava López, R. (2003). Physico-chemical characteristics of M. Longissimus dorsi from three lines of free-range reared Iberian pigs slaughtered at 90 kg live-weight and commercial pigs: A comparative study. *Meat Science*, 64(4), 499-506. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(02\)00228-0](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(02)00228-0)
- Fernández, A., Rodrigáñez, J., Toro, M. A., Rodríguez, M. C., y Silió, L. (2002). Inbreeding effects on the parameters of the growth function in three strains of Iberian pigs1. *Journal of Animal Science*, 80(9), 2267-2275. <https://doi.org/10.1093/ansci/80.9.2267>
- Fernández-Cabanás, V. M., Garrido-Varo, A., García Olmo, J., Pedro, E. D., y Dardenne, P. (2007). Optimisation of the spectral pre-treatments used for Iberian pig fat NIR calibrations. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 87(1), 104-112. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2006.10.005>
- Fernández-Cabanás, V. M., Polvillo, O., Rodríguez-Acuña, R., Botella, B., y Horcada, A. (2011). Rapid determination of the fatty acid profile in pork dry-cured sausages by NIR

- spectroscopy. *Food Chemistry*, 124(1), 373-378. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.06.031>
- Flores, J., Biron, C., Izquierdo, L., y Nieto, P. (1988). Characterization of green hams from Iberian pigs by fast analysis of subcutaneous fat. *Meat Science*, 23(4), 253-262. [https://doi.org/10.1016/0309-1740\(88\)90010-1](https://doi.org/10.1016/0309-1740(88)90010-1)
- Fuentes, V., Ventanas, S., Ventanas, J., y Estévez, M. (2014). The genetic background affects composition, oxidative stability and quality traits of Iberian dry-cured hams: Purebred Iberian versus reciprocal Iberian×Duroc crossbred pigs. *Meat Science*, 96(2, Part A), 737-743. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.10.010>
- Gallardo, E., Narváez-Rivas, M., Pablos, F., Jurado, J. M., y León-Camacho, M. (2012). Subcutaneous Fat Triacylglycerols Profile from Iberian Pigs as a Tool To Differentiate between Intensive and Extensive Fattening Systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(7), 1645-1651. <https://doi.org/10.1021/jf2045312>
- Gannes, L. Z., del Rio, C. M., y Koch, P. (1998). Natural Abundance Variations in Stable Isotopes and their Potential Uses in Animal Physiological Ecology. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular y Integrative Physiology*, 119(3), 725-737. [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(98\)01016-2](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(98)01016-2)
- García, C., Ventanas, J., Antequera, T., Ruiz, J., Cava, R., y Alvarez, P. (1996). Measuring Sensorial Quality of Iberian Ham by Rasch Model. *Journal of Food Quality*, 19(5), 397-412. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4557.1996.tb00434.x>
- García, F. I. H., Izquierdo, M., del Rosario González, A. I., Montero, A., Pérez, M., Gudiño, J. G., y Garrido, N. (2018). Adaptation of immunocastration treatment to montanera system for male Iberian pigs: Effects on reproductive organs and carcass traits. *Archivos de zootecnia*, 1, 97-100.
- García-González, D. L., Aparicio, R., y Aparicio-Ruiz, R. (2013). Volatile and Amino Acid Profiling of Dry Cured Hams from Different Swine Breeds and Processing Methods. *Molecules*, 18(4), Art. 4. <https://doi.org/10.3390/molecules18043927>
- García-Olmo, J. (2002). *Clasificación y autenticación de canales de cerdo ibérico mediante espectroscopía en el infrarrojo cercano (NIRS)* [Tesis Doctoral, Universidad de Córdoba]. <http://helvia.uco.es/xmlui/handle/10396/2340>
- García-Olmo, J., Garrido-Varo, A., y De Pedro, E. (2001). The Transfer of Fatty Acid Calibration Equations Using Four Sets of Unsealed Liquid Standardisation Samples. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 9(1), 49-62. <https://doi.org/10.1255/jnirs.294>
- García-Olmo, J., Garrido-Varo, A., y De Pedro, E. (2009). Classification of real farm conditions Iberian pigs according to the feeding regime whit multivariate models developed by using fatty acids composition or NRI spectral data. *Grasas y Aceites*, 60(3), 233-237.
- García-Valverde, R., Barea, R., Lara, L., Nieto, R., y Aguilera, J. F. (2008). The effects of feeding level upon protein and fat deposition in Iberian heavy pigs. *Livestock Science*, 114(2), 263-273. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2007.05.005>
- García-Valverde, R., Nieto, R., Lachica, M., y Aguilera, J. F. (2007). Effects of herbage ingestion on the digestion site and nitrogen balance in heavy Iberian pigs fed on an acorn-based diet. *Livestock Science*, 112(1), 63-77. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2007.01.161>
- Garrido-Delgado, R., Arce, L., y Valcárcel, M. (2012). Multi-capillary column-ion mobility spectrometry: A potential screening system to differentiate virgin olive oils. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 402(1), 489-498. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-5328-1>
- Garrido-Delgado, R., Eugenia Muñoz-Pérez, M., y Arce, L. (2018). Detection of adulteration in extra virgin olive oils by using UV-IMS and chemometric analysis. *Food Control*, 85, 292-299. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.10.012>

- Garrido-Fernández, A., y León-Camacho, M. (2021). Effect of season, feeding, and anatomical region on the triacylglycerol profile of Iberian pig fat. *Food Chemistry*, 361, 130070. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130070>
- Garrido-Novell, C., Garrido-Varo, A., Pérez-Marín, D., Guerrero-Ginel, J. E., y Kim, M. (2015). Quantification and spatial characterization of moisture and NaCl content of Iberian dry-cured ham slices using NIR hyperspectral imaging. *Journal of Food Engineering*, 153, 117-123. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2014.09.035>
- Garrido-Varo, A., García-Olmo, J., y Pérez-Marín, D. (2004). Analysis of Fats and Oils. En C. Roberts, J. J. Workman, y J. Reeves (Eds.), *Near-Infrared Spectroscopy in Agriculture* (Agronomy, Crop Science and Soil Science Societies of America, Madison, pp. 487-558).
- Geladi, P., MacDougall, D., y Martens, H. (1985). Linearization and Scatter-Correction for Near-Infrared Reflectance Spectra of Meat. *Applied Spectroscopy*, 39(3), 491-500.
- Gerhardt, N., Schwolow, S., Rohn, S., Pérez-Cacho, P. R., Galán-Soldevilla, H., Arce, L., y Weller, P. (2019). Quality assessment of olive oils based on temperature-ramped HS-GC-IMS and sensory evaluation: Comparison of different processing approaches by LDA, kNN, and SVM. *Food Chemistry*, 278, 720-728. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.11.095>
- Gilles, G. (2009). Dry cured ham quality as related to lipid quality of raw material and lipid changes during processing: A review. *Grasas y Aceites*, 60(3), Art. 3. <https://doi.org/10.3989/gya.130908>
- Gispert, M., Faucitano, L., Oliver, M. A., Guàrdia, M. D., Coll, C., Siggers, K., Harvey, K., y Diestre, A. (2000). A survey of pre-slaughter conditions, halothane gene frequency, and carcass and meat quality in five Spanish pig commercial abattoirs. *Meat Science*, 55(1), 97-106. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(99\)00130-8](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(99)00130-8)
- Gjerlaug-Enger, E., Kongsro, J., Aass, L., Ødegård, J., y Vangen, O. (2011). Prediction of fat quality in pig carcasses by near-infrared spectroscopy. *Animal*, 5(11), 1829-1841. <https://doi.org/10.1017/S1751731111000814>
- Goddu, R. F., y Delker, D. A. (1960). Spectra-structure correlations for near-infrared region. *Analytical Chemistry*, 32(1), 140-141.
- Gómez-Fernández, J., Horcajada, S., Tomás, C., Gómez-Izquierdo, E., y De-Mercado, E. (2013). Efecto de la inmunocastración y de la castración quirúrgica sobre los rendimientos productivos y la calidad de la canal en cerdas Ibéricas de cebo. *Itea-Informacion Tecnica Economica Agraria*, 109(1), 33-48.
- Gondret, F., y Leuret, B. (2002). Feeding intensity and dietary protein level affect adipocyte cellularity and lipogenic capacity of muscle homogenates in growing pigs, without modification of the expression of sterol regulatory element binding protein1,2. *Journal of Animal Science*, 80(12), 3184-3193. <https://doi.org/10.2527/2002.80123184x>
- González-Domínguez, R., Sayago, A., y Fernández-Recamales, Á. (2020). Fatty Acid Profiling for the Authentication of Iberian Hams According to the Feeding Regime. *Foods*, 9(2), Art. 2. <https://doi.org/10.3390/foods9020149>
- González-Martín, I., González-Pérez, C., Hernández Méndez, J., Marqués-Macias, E., y Sanz Poveda, F. (1999). Use of isotope analysis to characterize meat from Iberian-breed swine. *Meat Science*, 52(4), 437-441. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(99\)00027-3](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(99)00027-3)
- González-Martín, I., González-Pérez, C., Hernández-Méndez, J., Álvarez-García, N., y Merino Lázaro, S. (2002). Determination of Fatty Acids in the Subcutaneous Fat of Iberian Breed Swine by near Infrared Spectroscopy. A Comparative Study of the Methods for Obtaining Total Lipids: Solvents and Melting with Microwaves. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 10(4), 257-268. <https://doi.org/10.1255/jnirs.342>

- González-Martín, I., González-Pérez, C., Hernández-Méndez, J., Recio Hernández, C., y Sabio Rey, E. (1997). *Método para la caracterización y diferenciación del cerdo ibérico en función de la dieta* (Patent N.º 2326249).
- González-Martín, I., González Pérez, C., Hernández Méndez, J., y Sánchez González, C. (2001). Differentiation of dietary regimene of Iberian swine by means of isotopic analysis of carbon and sulphur in hepatic tissue. *Meat Science*, 58(1), 25-30. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(00\)00126-1](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(00)00126-1)
- González-Martín, I., González-Pérez, C., Alvarez-García, N., y González-Cabrera, J. M. (2005). On-line determination of fatty acid composition in intramuscular fat of Iberian pork loin by NIRs with a remote reflectance fibre optic probe. *Meat Science*, 69(2), 243-248. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2004.07.003>
- González-Martín, I., González-Pérez, C., Hernández-Méndez, J., y Alvarez-García, N. (2002). Mineral analysis (Fe, Zn, Ca, Na, K) of fresh Iberian pork loin by near infrared reflectance spectrometry: Determination of Fe, Na and K with a remote fibre-optic reflectance probe. *Analytica Chimica Acta*, 468(2), 293-301. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(02\)00657-8](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(02)00657-8)
- González-Martín, I., González-Pérez, C., Hernández-Méndez, J., y Alvarez-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(2), 713-719. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(02\)00273-5](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(02)00273-5)
- González-Martín, I., Pérez-Pavón, J. L., González-Pérez, C., Hernández-Méndez, J., y Álvarez-García, N. (2000). Differentiation of products derived from Iberian breed swine by electronic olfactometry (electronic nose). *Analytica Chimica Acta*, 424(2), 279-287. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(00\)01106-5](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)01106-5)
- Guàrdia, M. D., Estany, J., Balasch, S., Oliver, M. A., Gispert, M., y Diestre, A. (2009). Risk assessment of skin damage due to pre-slaughter conditions and RYR1 gene in pigs. *Meat Science*, 81(4), 745-751. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2008.11.020>
- Guillén, A., del Moral, F. G., Herrera, L. J., Rubio, G., Rojas, I., Valenzuela, O., y Pomares, H. (2010). Using near-infrared spectroscopy in the classification of white and iberian pork with neural networks. *Neural Computing and Applications*, 19(3), 465-470. <https://doi.org/10.1007/s00521-009-0327-2>
- Hassoun, A., Måge, I., Schmidt, W. F., Temiz, H. T., Li, L., Kim, H.-Y., Nilsen, H., Biancolillo, A., Aït-Kaddour, A., Sikorski, M., Sikorska, E., Grassi, S., y Cozzolino, D. (2020). Fraud in Animal Origin Food Products: Advances in Emerging Spectroscopic Detection Methods over the Past Five Years. *Foods*, 9(8), Art. 8. <https://doi.org/10.3390/foods9081069>
- Hedrick, H. B. (1983). Methods of Estimating Live Animal and Carcass Composition. *Journal of Animal Science*, 57(5), 1316-1327. <https://doi.org/10.2527/jas1983.5751316x>
- Helland, I. S., Næs, T., y Isaksson, T. (1995). Related versions of the multiplicative scatter correction method for preprocessing spectroscopic data. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 29(2), 233-241.
- Henry, C. M. (1999). Product Review: Near-IR gets the job done. *Analytical Chemistry*, 71(17), 625A-628A.
- Hernández Hierro, J.M. (2008). *Utilización de la tecnología NIRS con sonda de fibra óptica para el control de la calidad de alfalfa*. [Tesis doctoral, Universidad de Salamanca]. <https://doi.org/10.14201/greds.22596>.
- Hernández-Jiménez, M., Hernández-Ramos, P., Martínez-Martín, I., Vivar-Quintana, A. M., González-Martín, I., y Revilla, I. (2020). Comparison of artificial neural networks and multiple regression tools applied to near infrared spectroscopy for predicting sensory

- properties of products from quality labels. *Microchemical Journal*, 159, 105459. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105459>
- Hernández-Matamoros, A., González, E., García-Casco, J., y Tejeda, J. (2013). Determination of neophytadiene in the subcutaneous fat of Iberian pigs from different feeding systems. *grasas y aceites*, 64(2), 173-180.
- Hernández-Ramos, P., Vivar-Quintana, A. M., Revilla, I., González-Martín, M. I., Hernández-Jiménez, M., y Martínez-Martín, I. (2020). Prediction of Sensory Parameters of Cured Ham: A Study of the Viability of the Use of NIR Spectroscopy and Artificial Neural Networks. *Sensors*, 20(19), Art. 19. <https://doi.org/10.3390/s20195624>
- Hernández-Ramos, P. A. (2021). *Redes neuronales artificiales aplicadas a la predicción de parámetros en alimentos acogidos a marcas de calidad*. [Tesis Doctoral, Universidad de Salamanca]. <http://hdl.handle.net/10366/149363>
- Herschel, W. (1800). XIII. Investigation of the powers of the prismatic colours to heat and illuminate objects; with remarks, that prove the different refrangibility of radiant heat. To which is added, an inquiry into the method of viewing the sun advantageously, with telescopes of large apertures and high magnifying powers. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 90, 255-283. <https://doi.org/10.1098/rstl.1800.0014>
- Hervás, C., Garrido, A., Lucena, B., García, N., y De Pedro, E. (1994). Near Infrared Spectroscopy for Classification of Iberian Pig Carcasses Using an Artificial Neural Network. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 2(4), 177-184. <https://doi.org/10.1255/jnirs.44>
- Hobson, K. A., y Clark, R. G. (1992). Assessing Avian Diets Using Stable Isotopes I: Turnover of ¹³C in Tissues. *The Condor*, 94(1), 181-188. <https://doi.org/10.2307/1368807>
- Hong, E., Lee, S. Y., Jeong, J. Y., Park, J. M., Kim, B. H., Kwon, K., y Chun, H. S. (2017). Modern analytical methods for the detection of food fraud and adulteration by food category. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(12), 3877-3896. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8364>
- Horcada, A., Valera, M., Juárez, M., y Fernández-Cabanás, V. M. (2020). Authentication of Iberian pork official quality categories using a portable near infrared spectroscopy (NIRS) instrument. *Food Chemistry*, 318, 126-133. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126471>
- Høskuldsson, A. (1996). *Prediction Methods in Science and Technology: Basic Theory* (Vol. 1). Thor Publ.
- Houghton, P., y Turlington, L. (1992). Application of ultrasound for feeding and finishing animals: A review. *Journal of Animal Science*, 70(3), 930-941.
- Hudgins, L. C., Hellerstein, M. K., Seidman, C. E., Neese, R. A., Tremaroli, J. D., y Hirsch, J. (2000). Relationship between carbohydrate-induced hypertriglyceridemia and fatty acid synthesis in lean and obese subjects. *Journal of Lipid Research*, 41(4), 595-604. [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)32407-X](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)32407-X)
- Hughes, J. M., Oiseth, S. K., Purslow, P. P., y Warner, R. D. (2014). A structural approach to understanding the interactions between colour, water-holding capacity and tenderness. *Meat Science*, 98(3), 520-532. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.05.022>
- Infrasoft International LLC (2000). WinISI II Version 1.50.
- Llón, F. A., Garrigues, S., y de la Guardia, M. (2006). Combination of mid- and near-infrared spectroscopy for the determination of the quality properties of beers. *Analytica Chimica Acta*, 571(2), 167-174. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2006.04.070>
- Jombart, T., Devillard, S., y Balloux, F. (2010). Discriminant analysis of principal components: A new method for the analysis of genetically structured populations. *BMC Genetics*, 11(94), 1-15. Scopus.

- Juárez, M., Clemente, I., Polvillo, O., y Molina, A. (2009). Meat quality of tenderloin from Iberian pigs as affected by breed strain and crossbreeding. *Meat Science*, *81*(4), 573-579. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2008.10.016>
- Jurado, J. M., Jiménez-Lirola, A., Narváez-Rivas, M., Gallardo, E., Pablos, F., y León-Camacho, M. (2013). Characterization and quantification of 4-methylsterols and 4,4-dimethylsterols from Iberian pig subcutaneous fat by gas chromatography–mass spectrometry and gas chromatography–flame ionization detector and their use to authenticate the fattening systems. *Talanta*, *106*, 14-19. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.12.006>
- Kalogiouri, N. P., Aalizadeh, R., Dasenaki, M. E., y Thomaidis, N. S. (2020). Application of High Resolution Mass Spectrometric methods coupled with chemometric techniques in olive oil authenticity studies—A review. *Analytica Chimica Acta*, *1134*, 150-173. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.07.029>
- Kanu, A. B., y Hill, H. H. (2008). Ion mobility spectrometry detection for gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, *1177*(1), 12-27. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.10.110>
- Kapper, C., Klont, R. E., Verdonk, J. M. A. J., y Urlings, H. A. P. (2012). Prediction of pork quality with near infrared spectroscopy (NIRS): 1. Feasibility and robustness of NIRS measurements at laboratory scale. *Meat Science*, *91*(3), 294-299. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.02.005>
- Kapper, C., Klont, R. E., Verdonk, J. M. A. J., Williams, P. C., y Urlings, H. A. P. (2012). Prediction of pork quality with near infrared spectroscopy (NIRS) 2. Feasibility and robustness of NIRS measurements under production plant conditions. *Meat Science*, *91*(3), 300-305. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.02.006>
- Karpas, Z., Tilman, B., Gdalevsky, R., y Lorber, A. (2002). Determination of volatile biogenic amines in muscle food products by ion mobility spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, *463*(2), 155-163. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(02\)00378-1](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(02)00378-1)
- Kaufmann, K. C., Sampaio, K. A., García-Martín, J. F., y Barbin, D. F. (2022). Identification of coriander oil adulteration using a portable NIR spectrometer. *Food Control*, *132*, 108536. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108536>
- Keller, T., Miki, A., Regenscheit, P., Dirnhofer, R., Schneider, A., y Tsuchihashi, H. (1998). Detection of designer drugs in human hair by ion mobility spectrometry (IMS). *Forensic Science International*, *94*(1), 55-63. [https://doi.org/10.1016/S0379-0738\(98\)00051-6](https://doi.org/10.1016/S0379-0738(98)00051-6)
- Kennedy, B. V., y Krouse, H. R. (1990). Isotope fractionation by plants and animals: Implications for nutrition research. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, *68*(7), 960-972. <https://doi.org/10.1139/y90-146>
- Kobayashi, K.-I., Matsui, Y., Maebuchi, Y., Toyota, T., y Nakauchi, S. (2010). Near Infrared Spectroscopy and Hyperspectral Imaging for Prediction and Visualisation of Fat and Fatty Acid Content in Intact Raw Beef Cuts. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, *18*(5), 301-315. <https://doi.org/10.1255/jnirs.896>
- Kotiaho, T., Lauritsen, F. R., Degn, H., y Paakkanen, H. (1995). Membrane inlet ion mobility spectrometry for on-line measurement of ethanol in beer and in yeast fermentation. *Analytica Chimica Acta*, *309*(1), 317-325. [https://doi.org/10.1016/0003-2670\(95\)00086-F](https://doi.org/10.1016/0003-2670(95)00086-F)
- Kris-Etherton, P., Taylor, D. S., Yu-Poth, S., Huth, P., Moriarty, K., Fishell, V., Hargrove, R. L., Zhao, G., y Etherton, T. D. (2000). Polyunsaturated fatty acids in the food chain in the United States. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *71*(1), 179S-188S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/71.1.179S>
- Kucha, C. T., Liu, L., Ngadi, M., y Gariépy, C. (2021). Assessment of Intramuscular Fat Quality in Pork Using Hyperspectral Imaging. *Food Engineering Reviews*, *13*(1), 274-289. <https://doi.org/10.1007/s12393-020-09246-9>

- Lachica, M., y Aguilera, J. F. (2000). Estimation of the energy costs of locomotion in the Iberian pig (*Sus mediterraneus*). *British Journal of Nutrition*, 83(1), 35-41. <https://doi.org/10.1017/S0007114500000064>
- Latorre, M. A., Lázaro, R., Valencia, D. G., Medel, P., y Mateos, G. G. (2004). The effects of gender and slaughter weight on the growth performance, carcass traits, and meat quality characteristics of heavy pigs. *Journal of Animal Science*, 82(2), 526-533. <https://doi.org/10.1093/ansci/82.2.526>
- Latorre, M. A., Medel, P., Fuentetaja, A., Lázaro, R., y Mateos, G. G. (2003). Effect of gender, terminal sire line and age at slaughter on performance, carcass characteristics and meat quality of heavy pigs. *Animal Science*, 77(1), 33-45. <https://doi.org/10.1017/S1357729800053625>
- Lebret, B. (2008). Effects of feeding and rearing systems on growth, carcass composition and meat quality in pigs. *Animal*, 2(10), 1548-1558. <https://doi.org/10.1017/S1751731108002796>
- Lebret, B., Juin, H., Noblet, J., y Bonneau, M. (2001). The effects of two methods of increasing age at slaughter on carcass and muscle traits and meat sensory quality in pigs. *Animal Science*, 72(1), 87-94. <https://doi.org/10.1017/S1357729800055582>
- León-Camacho, M., Narváez Rivas, M., Viera Alcaide, I., y Vicario Romero, I. (2009). Different fattening systems of Iberian pig according to 1-alkene hydrocarbon content in the subcutaneous fat. *Grasas y aceites*, 60 (1), 68-76.
- Li, Y. H., Li, F. N., Duan, Y. H., Guo, Q. P., Wen, C. Y., Wang, W. L., Huang, X. G., y Yin, Y. L. (2018). Low-protein diet improves meat quality of growing and finishing pigs through changing lipid metabolism, fiber characteristics, and free amino acid profile of the muscle. *Journal of Animal Science*, 96(8), 3221-3232. <https://doi.org/10.1093/jas/sky116>
- Liao, Y.-T., Fan, Y.-X., y Cheng, F. (2010). On-line prediction of fresh pork quality using visible/near-infrared reflectance spectroscopy. *Meat Science*, 86(4), 901-907. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.07.011>
- Llobet, E., Gualdrón, O., Vinaixa, M., El-Barbri, N., Brezmes, J., Vilanova, X., Bouchikhi, B., Gómez, R., Carrasco, J. A., y Correig, X. (2007). Efficient feature selection for mass spectrometry based electronic nose applications. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 85(2), 253-261. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2006.07.002>
- López Bote, C. J., Fructuoso, G., y Mateos, G. G. (2000). *Sistemas de producción porcina y calidad de la carne. El cerdo ibérico. En XVI Curso de Especialización FEDNA: Avances en Nutrición y Alimentación Animal*. (C. De Blas, G. G. Mateos, y P. García-Rebollar, Eds.; Proceedings XVI FEDNA).
- López-Bote, C. J. (1998). Sustained utilization of the Iberian pig breed. *Meat Science*, 49, S17-S27. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(98\)90036-5](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(98)90036-5)
- López-Bote, C. J., Toldrá, F., Daza, A., Ferrer, J. M., Menoyo, D., Silió, L., y Rodríguez, M. C. (2008). Effect of exercise on skeletal muscle proteolytic enzyme activity and meat quality characteristics in Iberian pigs. *Meat Science*, 79(1), 71-76. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.08.002>
- López-Bote, C. J., Rey, A., y Isabel, B. (2001). *Alimentación del cerdo ibérico en la dehesa* (Buxadé y A. Daza, Eds.; Mundi-Prensa).
- López-Vidal, S., Rodríguez-Estévez, V., Lago, S., Arce, L., y Valcárcel, M. (2008). The Application of GC-MS and Chemometrics to Categorize the Feeding Regime of Iberian Pigs in Spain. *Chromatographia*, 68(7), 593-601. <https://doi.org/10.1365/s10337-008-0752-x>
- Lorido, L., Estévez, M., Ventanas, J., y Ventanas, S. (2015). Salt and intramuscular fat modulate dynamic perception of flavour and texture in dry-cured hams. *Meat Science*, 107, 39-48. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2015.03.025>

- Madeira, M. S., Costa, P., Alfaia, C. M., Lopes, P. A., Bessa, R. J. B., Lemos, J. P. C., y Prates, J. A. M. (2013). The increased intramuscular fat promoted by dietary lysine restriction in lean but not in fatty pig genotypes improves pork sensory attributes1. *Journal of Animal Science*, 91(7), 3177-3187. <https://doi.org/10.2527/jas.2012-5424>
- Mahesh, S., Jayas, D. S., Paliwal, J., y White, N. D. G. (2015). Comparison of Partial Least Squares Regression (PLSR) and Principal Components Regression (PCR) Methods for Protein and Hardness Predictions using the Near-Infrared (NIR) Hyperspectral Images of Bulk Samples of Canadian Wheat. *Food and Bioprocess Technology*, 8(1), 31-40. <https://doi.org/10.1007/s11947-014-1381-z>
- Maltin, C., Balcerzak, D., Tilley, R., y Delday, M. (2003). Determinants of meat quality: Tenderness. *Proceedings of the Nutrition Society*, 62(2), 337-347. <https://doi.org/10.1079/PNS2003248>
- Martens, H., Jensen, S., y Geladi, P. (1983). *Multivariate linearity transformation for near-infrared reflectance spectrometry*. 205-234.
- Martín-Gómez, A., Arroyo-Manzanares, N., Rodríguez-Estévez, V., y Arce, L. (2019). Use of a non-destructive sampling method for characterization of Iberian cured ham breed and feeding regime using GC-IMS. *Meat Science*, 152, 146-154. Scopus. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2019.02.018>
- Martínez-Martín, I., Hernández-Jiménez, M., Revilla, I., y Vivar-Quintana, A. M. (2023). Prediction of Mineral Composition in Wheat Flours Fortified with Lentil Flour Using NIR Technology. *Sensors*, 23(3), Art. 3. <https://doi.org/10.3390/s23031491>
- Massart, D., Vandeginste, B., Buydens, L., De Jong, S., Lewi, P., y Smeyers-Verbeke, J. (1997). *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A: Elsevier Science B. Amsterdam, The Netherlands*.
- Massart, D., Vandeginste, B., Buydens, L., De Jong, S., Lewin, P., y Smeyers-Verbeke, J. (1998). *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part B Elsevier. Amsterdam, The Netherlands*.
- Mattson, F. H., y Grundy, S. M. (1985). Comparison of effects of dietary saturated, monounsaturated, and polyunsaturated fatty acids on plasma lipids and lipoproteins in man. *Journal of Lipid Research*, 26(2), 194-202. [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)34389-3](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)34389-3)
- Mayoral, A. I., y Guillén, M. T., Vivo JM y Rovina A. 2005. Anatomía aplicada a la carnización del cerdo ibérico. Las carnes de Extremadura. El cerdo ibérico (2ª edición revisada). Gómez Nieves J. Mª. y Robina A.(editores). Junta de Extremadura, Consejería de Sanidad y Consumo, 41-73.
- Mayoral, A. I., Dorado, M., Guillén, M. T., Robina, A., Vivo, J. M., Vázquez, C., y Ruiz, J. (1999). Development of meat and carcass quality characteristics in Iberian pigs reared outdoors. *Meat Science*, 52(3), 315-324. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(99\)00008-X](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(99)00008-X)
- McLaren, D. G., McKeith, F. M., y Novakofski, J. (1989). Prediction of Carcass Characteristics at Market Weight from Serial Real-Time Ultrasound Measures of Backfat and Loin Eye Area in the Growing Pig. *Journal of Animal Science*, 67(7), 1657-1667. <https://doi.org/10.2527/jas1989.6771657x>
- Melgar, J., Cid, C., Astiasarán, I., y Bello, J. (1991). *Influencia de la alimentación del cerdo ibérico en las características de los compuestos relacionados con la grasa del jamón curado*. <https://dadun.unav.edu/handle/10171/37706>
- Mesías, F. J., Gaspar, P., Pulido, Á. F., Escribano, M., y Pulido, F. (2009). Consumers' preferences for Iberian dry-cured ham and the influence of mast feeding: An application of conjoint analysis in Spain. *Meat Science*, 83(4), 684-690. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2009.08.004>

- Millet, S., Raes, K., Van den Broeck, W., De Smet, S., y Janssens, G. P. J. (2005). Performance and meat quality of organically versus conventionally fed and housed pigs from weaning till slaughtering. *Meat Science*, 69(2), 335-341. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2004.08.003>
- Orden APA/213/2003, de 10 de febrero, por la que se establecen normas de desarrollo del Real decreto 1083/2001, de 5 de octubre, por el que se aprueba la Norma de calidad para el jamón ibérico, paleta ibérica y caña de lomo ibérico elaborados en España.
- Orden APA/3376/2007, de 12 de noviembre, por la que se aprueba el Reglamento del Libro Genealógico de la Raza Porcina Ibérica, Pub. L. Nº. Orden APA/3376/2007, BOE-A-2007-20079 47908 (2007). <https://www.boe.es/eli/es/o/2007/11/12/apa3376>
- Mishra, P., Verkleij, T., y Klont, R. (2021). Improved prediction of minced pork meat chemical properties with near-infrared spectroscopy by a fusion of scatter-correction techniques. *Infrared Physics y Technology*, 113, 103643. <https://doi.org/10.1016/j.infrared.2021.103643>
- Mohamed, E. S., Saleh, A. M., Belal, A. B., y Gad, A. (2018). Application of near-infrared reflectance for quantitative assessment of soil properties. *The Egyptian Journal of Remote Sensing and Space Science*, 21(1), 1-14. <https://doi.org/10.1016/j.ejrs.2017.02.001>
- Mohino, A. (1993). Obtención de carne, manipulación y sacrificio de animales. En M. J. Beriain (Ed.), *Tecnología y calidad de los productos cárnicos* (Departamentoo de AGriculutra, Ganadería y Montes del Gobierno de Navarra, pp. 13-28). Departamento de Agricultura, Ganadería y Montes.
- Morales, J., Pérez, J. F., Baucells, M. D., Mourot, J., y Gasa, J. (2002). Comparative digestibility and lipogenic activity in Landrace and Iberian finishing pigs fed ad libitum corn- and corn-sorghum-acorn-based diets. *Livestock Production Science*, 77(2), 195-205. [https://doi.org/10.1016/S0301-6226\(02\)00063-5](https://doi.org/10.1016/S0301-6226(02)00063-5)
- Mörlein, D., Rosner, F., Brand, S., Jenderka, K.-V., y Wicke, M. (2005). Non-destructive estimation of the intramuscular fat content of the longissimus muscle of pigs by means of spectral analysis of ultrasound echo signals. *Meat Science*, 69(2), 187-199. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2004.06.011>
- Mourot, J., y Kouba, M. (1998). Lipogenic enzyme activities in muscles of growing Large White and Meishan pigs. *Livestock Production Science*, 55(2), 127-133. [https://doi.org/10.1016/S0301-6226\(98\)00129-8](https://doi.org/10.1016/S0301-6226(98)00129-8)
- Muriel, E., Antequera, T., Petró, M. J., Andrés, A. I., y Ruiz, J. (2004). Volatile compounds in Iberian dry-cured loin. *Meat Science*, 68(3), 391-400. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2004.04.006>
- Muriel, E., Ruiz, J., Martin, D., Petron, M. J., y Antequera, T. (2004). Physico-Chemical and Sensory Characteristics of Dry-Cured Loin from Different Iberian Pig Lines. *Food Science and Technology International*, 10(2), 117-123. <https://doi.org/10.1177/1082013204043766>
- Murray, I. (1993). *Forage analysis by near infrared spectroscopy*. British Grassland Soc.
- Næs, T., Isaksson, T., Fearn, T., y Davies, T. (2002). *A user-friendly guide to multivariate calibration and classification* (Vol. 6). NIR Chichester.
- Narváez Rivas, M., León Camacho, M., y Vicario, I. M. (2009). *Fatty acid and triacylglycerol composition of the subcutaneous fat from iberian pigs fattened on the traditional feed: "Montanera". effect of anatomical location and length of feeding*. <https://doi.org/10.3989/gya.130308>
- Narváez-Rivas, M., Pablos, F., Jurado, J. M., y León-Camacho, M. (2011). Authentication of fattening diet of Iberian pigs according to their volatile compounds profile from raw

- subcutaneous fat. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 399(6), 2115-2122. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-4387-z>
- Narvaez-Rivas, M., Vicario, I. M., Jesus Alcalde, M., y Leon-Camacho, M. (2010). Volatile hydrocarbon profile of Iberian dry-cured hams. A possible tool for authentication of hams according to the fattening diet. *Talanta*, 81(4-5), 1224-1228. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2010.02.013>
- Newcom, D. W., Baas, T. J., Schwab, C. R., y Stalder, K. J. (2005). Genetic and phenotypic relationships between individual subcutaneous backfat layers and percentage of longissimus intramuscular fat in Duroc swine1. *Journal of Animal Science*, 83(2), 316-323. <https://doi.org/10.2527/2005.832316x>
- Nieto, R., y Aguilera, J. F. (2009). Uso del análisis isotópico del carbono y del nitrógeno en la trazabilidad de productos derivados del cerdo ibérico. *Anales de la Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental*, 22, 105-124.
- Nieto, R., Rivera, M., García, M. A., y Aguilera, J. F. (2002). Amino acid availability and energy value of acorn in the Iberian pig. *Livestock Production Science*, 77(2), 227-239. [https://doi.org/10.1016/S0301-6226\(02\)00040-4](https://doi.org/10.1016/S0301-6226(02)00040-4)
- Niñoles, L., Clemente, G., Ventanas, S., y Benedito, J. (2007). Quality assessment of Iberian pigs through backfat ultrasound characterization and fatty acid composition. *Meat Science*, 76(1), 102-111. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2006.10.018>
- Niñoles, L., Mulet, A., Ventanas, S., y Benedito, J. (2011). Ultrasonic characterisation of B. femoris from Iberian pigs of different genetics and feeding systems. *Meat Science*, 89(2), 174-180. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2011.04.014>
- NIRSystems instruments performance test guide. (1999). Foss NIRSystems, Inc., Silver Spring, MD, USA.
- Nobari Moghaddam, H., Tamiji, Z., Akbari Lakeh, M., Khoshayand, M. R., y Haji Mahmoodi, M. (2022). Multivariate analysis of food fraud: A review of NIR based instruments in tandem with chemometrics. *Journal of Food Composition and Analysis*, 107, 104343. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2021.104343>
- Noble, D. (1995). Illuminating near-IR. *Analytical Chemistry*, 67(23), 735A-740A.
- Nørgaard, L., Westerhaus, M., Kjeldahl, K., y Haunstrup, I. (2014). *Qualification: Adulteration screening with NIR- a case on skim milk powder*. P/N 1026716, Issue 1.
- Norris, K., y Williams, P. (1984). Optimization of mathematical treatments of raw near-infrared signal in the. *Cereal Chem*, 61(2), 158-165.
- Ogden, I. d., y Strachan, N. j. c. (1993). Enumeration of Escherichia coli in cooked and raw meats by ion mobility spectrometry. *Journal of Applied Bacteriology*, 74(4), 402-405. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1993.tb05145.x>
- Olea, L., y San Miguel-Ayanz, A. (2006). *The Spanish dehesa. A traditional Mediterranean silvopastoral system linking production and nature conservation*. 21st General Meeting of the European Grassland Federation.
- Ollivier, L. (2009). European pig genetic diversity: A minireview*. *Animal*, 3(7), 915-924. <https://doi.org/10.1017/S1751731109004297>
- Orden APA/3376/2007, de 12 de noviembre, por la que se aprueba el Reglamento del Libro Genealógico de la Raza Porcina Ibérica. BOE nº 280 del jueves 22 de noviembre de 2007.
- Ortiz, A., García-Torres, S., González, E., De Pedro-Sanz, E. J., Gaspar, P., y Tejerina, D. (2020). Quality traits of fresh and dry-cured loin from Iberian x Duroc crossbred pig in the Montanera system according to slaughtering age. *Meat Science*, 170, 108242. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2020.108242>
- Ortiz, A., León, L., Contador, R., y Tejerina, D. (2021a). Potencial Use of Near Infrared Spectroscopy (NIRS) to Categorise Chorizo Sausages from Iberian Pigs According to

- Several Quality Standards. *Applied Sciences*, 11(23), Art. 23. <https://doi.org/10.3390/app112311379>
- Ortiz, A., León, L., Contador, R., y Tejerina, D. (2021b). Near-Infrared Spectroscopy (NIRS) as a Tool for Classification of Pre-Sliced Iberian Salchichón, Modified Atmosphere Packaged (MAP) According to the Official Commercial Categories of Raw Meat. *Foods*, 10(8), Art. 8. <https://doi.org/10.3390/foods10081865>
- Ortiz, A., Tejerina, D., García-Torres, S., Gaspar, P., y González, E. (2021). Performance and carcass quality traits of Iberian × Duroc crossbred pig subject to gender and age at the beginning of the free-range finishing phase. *Animal*, 15(9), 100324. <https://doi.org/10.1016/j.animal.2021.100324>
- Osborne, B. G., y Fearn, T. (1986). *Near Infrared Spectroscopy in Food Analysis*. Longman Scientific and Technical.
- Osborne, B. G., Fearn, T., y Hindle, P. H. (1993). *Practical NIR spectroscopy with applications in food and beverage analysis*. Longman Scientific and Technical. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19931464035>
- Pearson, A. (1994). Introduction to quality attributes and their measurement in meat, poultry and fish products. *Quality attributes and their measurement in meat, poultry and fish products*, 1-33.
- Perán-Sánchez, F., Serrano, S., Gutiérrez de Ravé, E., Sánchez-López, E., Cumplido, A., y Jiménez-Hornero, F. J. (2020). Digital Image Filtering Optimization Supporting Iberian Ham Quality Prediction. *Foods*, 9(1), Art. 1. <https://doi.org/10.3390/foods9010025>
- Pérez-Juan, M., Afseth, N. K., González, J., Díaz, I., Gispert, M., Font i Furnols, M., Oliver, M. A., y Realini, C. E. (2010). Prediction of fatty acid composition using a NIRS fibre optics probe at two different locations of ham subcutaneous fat. *Food Research International*, 43(5), 1416-1422. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.04.006>
- Pérez-Marín, D., De Pedro Sanz, E., Guerrero-Ginel, J. E., y Garrido-Varo, A. (2009). A feasibility study on the use of near-infrared spectroscopy for prediction of the fatty acid profile in live Iberian pigs and carcasses. *Meat Science*, 83(4), 627-633. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2009.07.012>
- Pérez-Marín, D., Fearn, T., Guerrero, J. E., y Garrido-Varo, A. (2010). Robustness in pig fat NIRS calibrations by orthogonal projection. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 100(1), 36-40. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2009.10.003>
- Pérez-Marín, D., Fearn, T., Riccioli, C., De Pedro, E., y Garrido, A. (2021). Probabilistic classification models for the in situ authentication of iberian pig carcasses using near infrared spectroscopy. *Talanta*, 222, 121511. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121511>
- Pérez-Marín, D., Garrido-Varo, A., De Pedro, E., y Guerrero-Ginel, J. E. (2007). Chemometric utilities to achieve robustness in liquid NIRS calibrations: Application to pig fat analysis. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 87(2), 241-246. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2007.02.004>
- Pérez-Palacios, T., Antequera, T., Durán, M. L., Caro, A., Rodríguez, P. G., y Ruiz, J. (2010). MRI-based analysis, lipid composition and sensory traits for studying Iberian dry-cured hams from pigs fed with different diets. *Food Research International*, 43(1), 248-254. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.09.020>
- Pérez-Palacios, T., Caballero, D., Antequera, T., Durán, M. L., Ávila, M., y Caro, A. (2017). Optimization of MRI Acquisition and Texture Analysis to Predict Physico-chemical Parameters of Loins by Data Mining. *Food and Bioprocess Technology*, 10(4), 750-758. <https://doi.org/10.1007/s11947-016-1853-4>
- Pérez-Palacios, T., Ruiz, J., Martín, D., Barat, J. M., y Antequera, T. (2011). Pre-cure Freezing Effect on Physicochemical, Texture and Sensory Characteristics of Iberian Ham. *Food*

- Science and Technology International*, 17(2), 127-133.
<https://doi.org/10.1177/1082013210381435>
- Pérez-Palacios, T., Ruiz, J., Tejeda, J. F., y Antequera, T. (2009). Subcutaneous and intramuscular lipid traits as tools for classifying Iberian pigs as a function of their feeding background. *Meat Science*, 81(4), 632-640. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2008.10.022>
- Perona, J. S., y Ruiz-Gutierrez, V. (2005). Quantitative Lipid Composition of Iberian Pig Muscle and Adipose Tissue by HPLC. *Journal of Liquid Chromatography y Related Technologies*, 28(15), 2445-2457. <https://doi.org/10.1080/10826070500187707>
- Petrón, M. J., Durán, L., Ávila, M., Cernadas, E., y Antequera, T. (2003). A computer vision system to discriminate iberian pigs from ham images. *Electron. J. Environ. Agric. Food Chem*, 2(5), 549-557.
- Petrón, M. J., Muriel, E., Timón, M. L., Martín, L., y Antequera, T. (2004). Fatty acids and triacylglycerols profiles from different types of Iberian dry-cured hams. *Meat Science*, 68(1), 71-77. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2004.01.012>
- Petrón, M. J., Tejeda, J. F., Muriel, E., Ventanas, J., y Antequera, T. (2005). Study of the branched hydrocarbon fraction of intramuscular lipids from Iberian dry-cured ham. *Meat Science*, 69(1), 129-134. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2004.06.014>
- Pomar, C., Pomar, J., Dubeau, F., Joannopoulos, E., y Dussault, J.-P. (2014). The impact of daily multiphase feeding on animal performance, body composition, nitrogen and phosphorus excretions, and feed costs in growing–finishing pigs. *Animal*, 8(5), 704-713. <https://doi.org/10.1017/S1751731114000408>
- Porras-Tejeiro, C., Pérez Almero, J., Brun Esquiliche, P., y Casas Millán, C. (2009). Validez analítica de los ácidos grasos en cerdo Ibérico. *Sólo Cerdo Ibérico*, 21, 85-89.
- Poto, A., Galián, M., y Peinado, B. (2007). Chato Murciano pig and its crosses with Iberian and Large White pigs, reared outdoors. Comparative study of the carcass and meat characteristics. *Livestock Science*, 111(1), 96-103. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2006.12.005>
- Prevolnik, M., Čandek-Potokar, M., y Škorjanc, D. (2011). Ability of NIR spectroscopy to predict meat chemical composition and quality – a review. *Czech Journal of Animal Science*, 49(11), 500-510. <https://doi.org/10.17221/4337-cjas>
- Prevolnik, M., Škrlep, M., Škornjac, D., y Čandek-Potokar, M. (2010). Application of near infrared spectroscopy to predict chemical composition of meat and meat products. *Scientific Journal «Meat Technology»*, 51(2), Art. 2.
- Prieto, N., Dugan, M. E. R., Juárez, M., López-Campos, Ó., Zijlstra, R. T., y Aalhus, J. L. (2018). Real Time Prediction of Backfat Composition and Iodine Value by Portable Near Infrared Spectroscopy in a Diverse Population of Pigs. *Meat and Muscle Biology*, 1(2), Art. 2. <https://doi.org/10.221751/rmc2016.089>
- Prieto, N., Pawluczyk, O., Dugan, M. E. R., y Aalhus, J. L. (2017). A Review of the Principles and Applications of Near-Infrared Spectroscopy to Characterize Meat, Fat, and Meat Products. *Applied Spectroscopy*, 71(7), 1403-1426. <https://doi.org/10.1177/0003702817709299>
- Prieto, N., Roehe, R., Lavín, P., Batten, G., y Andrés, S. (2009). Application of near infrared reflectance spectroscopy to predict meat and meat products quality: A review. *Meat Science*, 83(2), 175-186. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2009.04.016>
- Prieto, N., Uttaro, B., Mapiye, C., Turner, T. D., Dugan, M. E. R., Zamora, V., Young, M., y Beltranena, E. (2014). Predicting fat quality from pigs fed reduced-oil corn dried distillers grains with solubles by near infrared reflectance spectroscopy: Fatty acid composition and iodine value. *Meat Science*, 98(4), 585-590. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.06.009>

- Qi, Z., Wu, X., Yang, Y., Wu, B., y Fu, H. (2022). Discrimination of the Red Jujube Varieties Using a Portable NIR Spectrometer and Fuzzy Improved Linear Discriminant Analysis. *Foods*, 11(5), Art. 5. <https://doi.org/10.3390/foods11050763>
- Qiao, J., Ngadi, M. O., Wang, N., Gariépy, C., y Prasher, Shiv. O. (2007). Pork quality and marbling level assessment using a hyperspectral imaging system. *Journal of Food Engineering*, 83(1), 10-16. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2007.02.038>
- Qiao, J., Wang, N., Ngadi, M. O., Gunenc, A., Monroy, M., Gariépy, C., y Prasher, S. O. (2007). Prediction of drip-loss, pH, and color for pork using a hyperspectral imaging technique. *Meat Science*, 76(1), 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2006.06.031>
- Ramírez, R., y Cava, R. (2007). Carcass composition and meat quality of three different Iberian×Duroc genotype pigs. *Meat Science*, 75(3), 388-396. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2006.08.003>
- Ramírez-Morales, I., Aguilar, L., Fernandez-Blanco, E., Rivero, D., Perez, J., y Pazos, A. (2021). Detection of Bovine Mastitis in Raw Milk, Using a Low-Cost NIR Spectrometer and k-NN Algorithm. *Applied Sciences*, 11(22), Art. 22. <https://doi.org/10.3390/app112210751>
- Real Decreto 324/2000, de 3 de marzo, por el que se establecen normas básicas de rdenación de las explotaciones porcinas.
- Real Decreto 1083/2001, de 5 de octubre, por el que se aprueba la Norma de calidad para el Jamón ibérico, paleta ibérica y caña de lomo ibérico elaborados en España. Orden APA/213/2003.
- Real Decreto 1135/2002, de 31 de octubre, relativo a las normas mínimas para la protección de cerdos.
- Real Decreto 2128/2004, de 29 de octubre, por el que se regula el sistema de información geográfica de parcelas agrícolas.
- Real Decreto 1469/2007, de 2 de noviembre, por el que se aprueba la norma de calidad para la carne, el jamón, la paleta y la caña de lomos ibéricos.
- Real Decreto 1221/2009, de 17 de julio, por el que se establecen normas básicas de ordenación de las explotaciones de ganado porcino extensivo.
- Real Decreto 4/2014, de 10 de enero, por el que se aprueba la norma de calidad para la carne, el jamón, la paleta y la caña de lomo ibérico.
- Real Decreto 818/2015, de 11 de septiembre, por el que se modifican los anexos I y II del Real Decreto 1113/2006, de 29 de septiembre, por el que se aprueban las normas de calidad para quesos y quesos fundidos, y por el que se modifica la disposición transitoria segunda del Real Decreto 4/2014, de 10 de enero por el que se aprueba la norma de calidad para la carne, el jamón, la paleta y la caña de lomo ibérico.
- Real Decreto 255/2016, de 10 de junio, por el que se modifica el Real Decreto 4/2014, de 10 de enero, por el que se aprueba la norma de calidad para la carne, el jamón, la paleta y la caña de lomo ibérico.
- Recio, C. (2010). Métodos isotópicos como herramienta para determinar la alimentación aportada al cerdo Ibérico (GC-C-IRMS de ácidos grasos y otras técnicas). *Sólo cerdo Ibérico*, 23, 29-45.
- Recio, C., Martín, Q., y Raposo, C. (2013). GC-C-IRMS analysis of FAMEs as a tool to ascertain the diet of Iberian pigs used for the production of pork products with high added value. *Grasas y Aceites*, 64(2), Art. 2. <https://doi.org/10.3989/gya.130712>
- Revilla, I., Vivar-Quintana, A. M., González-Martín, M. I., Hernández-Jiménez, M., Martínez-Martín, I., y Hernández-Ramos, P. (2020). NIR Spectroscopy for Discriminating and Predicting the Sensory Profile of Dry-Cured Beef “Cecina”. *Sensors*, 20(23), Art. 23. <https://doi.org/10.3390/s20236892>

- Rey, A. I., Amazán, D., y García-Casco, J. (2013). A practical study on the feasibility of alpha and gamma-tocopherol quantification for distinguishing Iberian pig feeding systems. *grasas y aceites*, 64(2), 138-147.
- Rey, A. I., Daza, A., Amaya, O., y Bote, C. J. L. (2003). Efecto de la vitamina E y del cobre sobre el perfil de ácidos grasos y la estabilidad oxidativa del músculo y tejido hepático de cerdos ibéricos. *Sólo Cerdo Ibérico*, 10, 95-103.
- Rey, A. I., Daza, A., López-Carrasco, C., y López-Bote, C. J. (2006). Feeding Iberian pigs with acorns and grass in either free-range or confinement affects the carcass characteristics and fatty acids and tocopherols accumulation in Longissimus dorsi muscle and backfat. *Meat Science*, 73(1), 66-74. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2005.10.018>
- Rey, A. I., y López-Bote, C. J. (2014). Alpha-tocopherol stereoisomer analysis as discriminant method for distinguishing Iberian pig feed intake during the fattening phase. *Food Chemistry*, 142, 342-348. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.07.055>
- Rey, A. I., López-Bote, C. J., Daza, A., y Lauridsen, C. (2010). Accumulation and evolution of tocopherols in dry-cured hams from Iberian pigs as affected by their feeding and rearing system. *Food Chemistry*, 123(4), 1170-1175. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.05.082>
- Rey Muñoz, A. I., y López Bote, C. (2008). *Procedimiento para diferenciar la alimentación del cerdo ibérico durante el cebo*. ES2275407B2 (Patent N.º ES2275407B2).
- Rivas, M. N., Rios, J. J., Arteaga, J. F., Quilez, J. F., Barrero, A. F., y León-Camacho, M. (2008). Determination of ent-kaurene in subcutaneous fat of Iberian pigs by gas chromatography multi-stage mass spectrometry with the aim to differentiate between intensive and extensive fattening systems. *Analytica Chimica Acta*, 624(1), 107-112. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.06.035>
- Rodríguez-Hernández, P., Saavedra, D., Martín-Gómez, A., Cardador, M. J., Arce, L., y Rodríguez-Estévez, V. (2022). In vivo authentication of iberian pig feeding regime using faecal volatilome information. *Livestock Science*, 260, 104913. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2022.104913>
- Rodríguez-Sánchez, J. A., Ripoll, G., y Latorre, M. A. (2010). The influence of age at the beginning of Montanera period on meat characteristics and fat quality of outdoor Iberian pigs. *Animal*, 4(2), 289-294. <https://doi.org/10.1017/S1751731109991029>
- Rodríguez-Sánchez, J. A., Sanz, M. A., Blanco, M., Serrano, M. P., Joy, M., y Latorre, M. A. (2011). The influence of dietary lysine restriction during the finishing period on growth performance and carcass, meat, and fat characteristics of barrows and gilts intended for dry-cured ham production1. *Journal of Animal Science*, 89(11), 3651-3662. <https://doi.org/10.2527/jas.2010-3791>
- Ruiz, J., Cava, R., Antequera, T., Martín, L., Ventanas, J., y López-Bote, C. J. (1998). Prediction of the feeding background of Iberian pigs using the fatty acid profile of subcutaneous, muscle and hepatic fat. *Meat Science*, 49(2), 155-163. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(97\)00136-8](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(97)00136-8)
- Ruiz, J., Muriel, E., y Antequera, T. (2006). Calidad de carne de cerdo Ibérico in. *Las carnes de Extremadura, El cerdo Ibérico*, 71-86.
- Ruiz, J., y Petró, M. J. (2000). Métodos para la clasificación de la materia prima. En *Tecnología del jamón Ibérico. De los sistemas tradicionales a la explotación racional del sabor y el aroma*. (Ediciones Mundi-Prensa, pp. 131-160).
- Ruiz, J., Ventanas, J., Cava, R., Timón, M. L., y García, C. (1998). Sensory characteristics of Iberian ham: Influence of processing time and slice location. *Food Research International*, 31(1), 53-58. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(98\)00060-X](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(98)00060-X)

- Ruiz-Carrascal, J., Ventanas, J., Cava, R., Andrés, A. I., y García, C. (2000). Texture and appearance of dry cured ham as affected by fat content and fatty acid composition. *Food Research International*, 33(2), 91-95. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(99\)00153-2](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(99)00153-2)
- Ruusunen, M., Partanen, K., Pösö, R., y Puolanne, E. (2007). The effect of dietary protein supply on carcass composition, size of organs, muscle properties and meat quality of pigs. *Livestock Science*, 107(2), 170-181. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2006.09.021>
- Sánchez del Pulgar, J., Soukoulis, C., Carrapiso, A. I., Cappellin, L., Granitto, P., Aprea, E., Romano, A., Gasperi, F., y Biasioli, F. (2013). Effect of the pig rearing system on the final volatile profile of Iberian dry-cured ham as detected by PTR-ToF-MS. *Meat Science*, 93(3), Art. 3. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.10.003>
- SanCristobal, M., Chevalet, C., Haley, C. S., Joosten, R., Rattink, A. P., Harlizius, B., Groenen, M. a. M., Amigues, Y., Boscher, M.-Y., Russell, G., Law, A., Davoli, R., Russo, V., Désautés, C., Alderson, L., Fimland, E., Bagga, M., Delgado, J. V., Vega-Pla, J. L., ... Cardellino, R. (2006). Genetic diversity within and between European pig breeds using microsatellite markers. *Animal Genetics*, 37(3), 189-198. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2005.01385.x>
- Santos, J. P., García, M., Aleixandre, M., Horrillo, M. C., Gutiérrez, J., Sayago, I., Fernández, M. J., y Arés, L. (2004). Electronic nose for the identification of pig feeding and ripening time in Iberian hams. *Meat Science*, 66(3), 727-732. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2003.07.005>
- Sanz-Fernández, S., Díaz-Gaona, C., Casas-Rosal, J. C., Quintanilla, R., López, P., Alòs, N., y Rodríguez-Estévez, V. (2022). Second litter syndrome in Iberian pig breed: Factors influencing the performance. *Animal*, 16(12), 100675. <https://doi.org/10.1016/j.animal.2022.100675>
- Savenije, B., Geesink, G. H., van der Palen, J. G. P., y Hemke, G. (2006). Prediction of pork quality using visible/near-infrared reflectance spectroscopy. *Meat Science*, 73(1), 181-184. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2005.11.006>
- Sereno, J. R. B., Suárez, M. V., Barba Capote, C. J., Forero, J., Delgado-Bermejo, J. V., y Diéguez, E. (2002). Caracterización reproductiva de varias razas porcinas de origen ibérico. I. Análisis descriptivo. *Archivos de zootecnia* 51 (193), 245-248 (2002). <http://helvia.uco.es/xmlui/handle/10396/2906>
- Serra, X., Gil, F., Pérez-Enciso, M., Oliver, M. A., Vázquez, J. M., Gispert, M., Díaz, I., Moreno, F., Latorre, R., y Noguera, J. L. (1998). A comparison of carcass, meat quality and histochemical characteristics of Iberian (Guadyerbas line) and Landrace pigs. *Livestock Production Science*, 56(3), 215-223. [https://doi.org/10.1016/S0301-6226\(98\)00151-1](https://doi.org/10.1016/S0301-6226(98)00151-1)
- Serrano, M. P., Valencia, D. G., Fuentetaja, A., Lázaro, R., y Mateos, G. G. (2008). Effect of gender and castration of females and slaughter weight on performance and carcass and meat quality of Iberian pigs reared under intensive management systems. *Meat Science*, 80(4), 1122-1128. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2008.05.005>
- Serrano, M. P., Valencia, D. G., Fuentetaja, A., Lázaro, R., y Mateos, G. G. (2009). Effect of castration on productive performance, carcass characteristics and meat quality of Iberian pig females reared under intensive management systems. *Livestock Science*, 123(2), 147-153. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2008.11.001>
- Serrano, S., Perán, F., Gutiérrez de Ravé, E., Cumplido, A., y Jiménez-Hornero, F. J. (2019). Multifractal analysis application to the study of fat and its infiltration in Iberian ham: Influence of racial and feeding factors and type of slicing. *Meat Science*, 148, 55-63. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2018.10.004>
- Serrano, S., Perán, F., Jiménez-Hornero, F. J., y Gutiérrez de Ravé, E. (2013). Multifractal analysis application to the characterization of fatty infiltration in Iberian and White pork sirloins. *Meat Science*, 93(3), 723-732. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.11.015>

- Shenk, J., y Westerhaus, M. (1995). *Analysis of agriculture and food products by near infrared reflectance spectroscopy. Monograph. 12101 Tech Road, Silver Spring, MD 20904, USA: NIRSystems.*
- Shenk, JS., Westerhaus, M. O., y Workman, J. J. (1992). *Application of NIR spectroscopy to agricultural products* (D.A. Burns). Ciurczak, Handbook of Near Infrared Analysis, Practical Spectroscopy Series, Marcel Dekker. <https://ci.nii.ac.jp/naid/10008263819/>
- Siesler, H. W., Ozaki, Y., Kawata, S., y Heise, H. M. (2002). *Near Infrared Spectroscopy: Principles, instruments, applications. Wiley-Vch, Weinhen.* Wiley-Vch.
- Skiba, G., Fandreyewski, H., Raj, S., y Weremko, D. (2002). The influence of previous protein or energy restriction of young pigs on their daily gain composition. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 11(2), 299-308. <https://doi.org/10.22358/jafs/67814/2002>
- Skoog, D. H., Nieman, F., y de Análisis Instrumental, T. P. (2001). Editorial McGRAW-HILL. *España. Quinta edición. Pág, 922, 12.*
- Smith, D. R., Knabe, D. A., y Smith, S. B. (1996). Depression of lipogenesis in swine adipose tissue by specific dietary fatty acids. *Journal of Animal Science*, 74(5), 975-983. <https://doi.org/10.2527/1996.745975x>
- Sørensen, K. M., Petersen, H., y Engelsen, S. B. (2012). An On-Line Near-Infrared (NIR) Transmission Method for Determining Depth Profiles of Fatty Acid Composition and Iodine Value in Porcine Adipose Fat Tissue. *Applied Spectroscopy*, 66(2), 218-226.
- Srinuttrakul, W., Mihailova, A., Islam, M. D., Liebisch, B., Maxwell, F., Kelly, S. D., y Cannavan, A. (2021). Geographical Differentiation of Hom Mali Rice Cultivated in Different Regions of Thailand Using FTIR-ATR and NIR Spectroscopy. *Foods*, 10(8), Art. 8. <https://doi.org/10.3390/foods10081951>
- Stark, E., y Luchter, K. (2003). *Diversity in NIR instrumentation.* 55-66.
- Strachan, N. J. C., y Ogden, I. D. (1993). A rapid method for the enumeration of coliforms in processed foods by ion mobility spectrometry. *Letters in Applied Microbiology*, 17(5), 228-230. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.1993.tb01453.x>
- Szabo de Edelenyi, F., Egnell, M., Galan, P., Druesne-Pecollo, N., Herberg, S., y Julia, C. (2019). Ability of the Nutri-Score front-of-pack nutrition label to discriminate the nutritional quality of foods in the German food market and consistency with nutritional recommendations. *Archives of Public Health*, 77(1), 28. <https://doi.org/10.1186/s13690-019-0357-x>
- Tejeda, J. F., Antequera, T., Martín, L., Ventanas, J., y García, C. (2001). Study of the branched hydrocarbon fraction of intramuscular lipids from Iberian fresh ham. *Meat Science*, 58(2), 175-179. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(00\)00148-0](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(00)00148-0)
- Tejeda, J. F., Gandemer, G., Antequera, T., Viau, M., y García, C. (2002). Lipid traits of muscles as related to genotype and fattening diet in Iberian pigs: Total intramuscular lipids and triacylglycerols. *Meat Science*, 60(4), 357-363. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(01\)00143-7](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(01)00143-7)
- Tejeda, J. F., Hernández-Matamoros, A., García-Cascos, J. M., y González, E. (2020). Variability in subcutaneous fat composition of Iberian pigs reared in free-range conditions in the southwest of the Iberian Peninsula. *Canadian Journal of Animal Science*, 100(4), 665-673. <https://doi.org/10.1139/cjas-2019-0191>
- Tejeda, J. F., García, C., Muriel, E., y Antequera, T. (2002). Muscle lipid composition of Iberian pig meat as related to genetic line. *48th Int Congr of Meat Science and Technology, Roma, Italy, 2.*
- Tejerina, D., Contador, R., y Ortiz, A. (2021). Near infrared spectroscopy (NIRS) as tool for classification into official commercial categories and shelf-life storage times of pre-sliced modified atmosphere packaged Iberian dry-cured loin. *Food Chemistry*, 356, 129733. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129733>

- Tejerina, D., García-Torres, S., Cabeza de Vaca, M., Vázquez, F. M., y Cava, R. (2011). Acorns (*Quercus rotundifolia* Lam.) and grass as natural sources of antioxidants and fatty acids in the “montanera” feeding of Iberian pig: Intra- and inter-annual variations. *Food Chemistry*, 124(3), 997-1004. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.07.058>
- Tejerina, D., García-Torres, S., Cabeza de Vaca, M., Vázquez, F. M., y Cava, R. (2012). Effect of production system on physical–chemical, antioxidant and fatty acids composition of Longissimus dorsi and Serratus ventralis muscles from Iberian pig. *Food Chemistry*, 133(2), 293-299. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.01.025>
- Tharwat, A., Gaber, T., Ibrahim, A., y Hassanien, A. E. (2017). Linear discriminant analysis: A detailed tutorial. *AI Communications*, 30(2), 169-190. <https://doi.org/10.3233/AIC-170729>
- Timón, M. L., Martín, L., Petró, M. J., Jurado, Á., y García, C. (2002). Composition of subcutaneous fat from dry-cured Iberian hams as influenced by pig feeding. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82(2), 186-191. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1017>
- Trygg, J., y Wold, S. (2002). Orthogonal projections to latent structures (O-PLS). *Journal of Chemometrics*, 16(3), 119-128. <https://doi.org/10.1002/cem.695>
- Varmuza, K., y Filzmoser, P. (2009). *Introduction to multivariate statistical analysis in chemometrics*. CRC press. <https://doi.org/10.1201/9781420059496>
- Vásquez, N., Magán, C., Oblitas, J., Chuquizuta, T., Avila-George, H., y Castro, W. (2018). Comparison between artificial neural network and partial least squares regression models for hardness modeling during the ripening process of Swiss-type cheese using spectral profiles. *Journal of Food Engineering*, 219, 8-15. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.09.008>
- Vautz, W., Baumbach, J. I., y Uhde, E. (2006). Detection of emissions from surfaces using ion mobility spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 384(4), 980-986. <https://doi.org/10.1007/s00216-005-0240-1>
- Velarde, A., y Dalmau, A. (2012). Animal welfare assessment at slaughter in Europe: Moving from inputs to outputs. *Meat Science*, 92(3), 244-251. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.04.009>
- Ventanas, J. (2001). *Tecnología del jamón Ibérico: De los sistemas tradicionales a la explotación racional del sabor y el aroma*. Mundi-Prensa.
- Ventanas, J. (2008). *El jamón Ibérico: De la dehesa al paladar*. Mundi-Prensa.
- Ventanas, J. (2012). *Jamón Ibérico y Serrano. Fundamentos de la elaboración y de la calidad*. Editorial Paraninfo.
- Ventanas, S., Estevez, M., Tejeda, J. F., y Ruiz, J. (2006). Protein and lipid oxidation in Longissimus dorsi and dry cured loin from Iberian pigs as affected by crossbreeding and diet. *Meat Science*, 72(4), 647-655. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2005.09.011>
- Ventanas, S., Ruiz, J., García, C., y Ventanas, J. (2007). Preference and juiciness of Iberian dry-cured loin as affected by intramuscular fat content, crossbreeding and rearing system. *Meat Science*, 77(3), 324-330. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.04.001>
- Ventanas, S., Tejeda, J. F., y Estévez, M. (2008). Chemical composition and oxidative status of tissues from Iberian pigs as affected by diets: Extensive feeding v. oleic acid- and tocopherol-enriched mixed diets. *Animal*, 2(4), 621-630. <https://doi.org/10.1017/S1751731107001528>
- Ventanas, S., Ventanas, J., Jurado, Á., y Estévez, M. (2006). Quality traits in muscle biceps femoris and back-fat from purebred Iberian and reciprocal Iberian×Duroc crossbred pigs. *Meat Science*, 73(4), 651-659. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2006.03.009>
- Ventanas, S., Ventanas, J., Ruiz, J., y Estévez, M. (2005). *Iberian pigs for the development of high-quality cured products. Recent research in development in agricultural and food chemistry*. (Research Singpost). Transworld Research Network.

- Ventanas, S., Ventanas, J., Tovar, J., García, C., y Estévez, M. (2007). Extensive feeding versus oleic acid and tocopherol enriched mixed diets for the production of Iberian dry-cured hams: Effect on chemical composition, oxidative status and sensory traits. *Meat Science*, 77(2), 246-256. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.03.010>
- Vicente Hinestroza, L. A., Morales Toledo, L., Moreno Martínez, V. A., & Pérez Reséndiz, J. A. (2014). *Anarmonicidad y Resonancia en Vibraciones de Moléculas* (p. 24). Departamento de Física y Química Teórica.
- Viera Alcaide, I., Vicario, I. M., Escudero Gilete, M. L., Graciani Constante, E., y León Camacho, M. (2008). A multivariate study of the triacylglycerols composition of the subcutaneous adipose tissue of Iberian pig in relation to the fattening diet and genotype. <https://doi.org/10.3989/gya.2008.v59.i4.526>
- Viera-Alcaide, I., Vicario, I. M., Graciani Constante, E., y León-Camacho, M. (2007). Authentication of fattening diet of Iberian pig according to their triacylglycerols profile from subcutaneous fat. *Analytica Chimica Acta*, 596(2), 319-324. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.06.026>
- Weeranantanaphan, J., Downey, G., Allen, P., y Sun, D.-W. (2011). A Review of near Infrared Spectroscopy in Muscle Food Analysis: 2005–2010. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 19(2), 61-104.
- Westerhuis, J. A., van Velzen, E. J. J., Hoefsloot, H. C. J., y Smilde, A. K. (2010). Multivariate paired data analysis: Multilevel PLSDA versus OPLSDA. *Metabolomics*, 6(1), 119-128. <https://doi.org/10.1007/s11306-009-0185-z>
- Whang, K. Y., Kim, S. W., Donovan, S. M., McKeith, F. K., y Easter, R. A. (2003). Effects of protein deprivation on subsequent growth performance, gain of body components, and protein requirements in growing pigs. *Journal of Animal Science*, 81(3), 705-716. <https://doi.org/10.2527/2003.813705x>
- Williams, P. (1987). Variables affecting near-infrared reflectance spectroscopic analysis. *Near-infrared technology in the agricultural and food industries*, 143-167.
- Wold, H. (1975). 11 - Path Models with Latent Variables: The NIPALS Approach**NIPALS = Nonlinear Iterative PARTial Least Squares. En H. M. Blalock, A. Aganbegian, F. M. Borodkin, R. Boudon, y V. Capecchi (Eds.), *Quantitative Sociology* (pp. 307-357). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-103950-9.50017-4>
- Wood, J. D. (1984). *Fat quality in pig meat*. U.K. Commission of E.C. Ed. *Fat Quality in Lean Pigs*. Meat Research Institute Special Report N<2. Brussels (Belgiu). 9-14.
- Wood, J. D., Lambe, N. R., Walling, G. A., Whitney, H., Jagger, S., Fullarton, P. J., Bayntun, J., Hallett, K., y Bünger, L. (2013). Effects of low protein diets on pigs with a lean genotype. 1. Carcass composition measured by dissection and muscle fatty acid composition. *Meat Science*, 95(1), 123-128. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.03.001>
- Wood, J. D., Nute, G. R., Richardson, R. I., Whittington, F. M., Southwood, O., Plastow, G., Mansbridge, R., da Costa, N., y Chang, K. C. (2004). Effects of breed, diet and muscle on fat deposition and eating quality in pigs. *Meat Science*, 67(4), 651-667. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2004.01.007>
- Workman, J. J. (1999). Review of Process and Non-invasive Near-Infrared and Infrared Spectroscopy: 1993–1999. *Applied Spectroscopy Reviews*, 34(1-2), 1-89. <https://doi.org/10.1081/ASR-100100839>
- Wu, X., Kumar, V., Ross Quinlan, J., Ghosh, J., Yang, Q., Motoda, H., McLachlan, G. J., Ng, A., Liu, B., Yu, P. S., Zhou, Z.-H., Steinbach, M., Hand, D. J., y Steinberg, D. (2008). Top 10 algorithms in data mining. *Knowledge and Information Systems*, 14(1), 1-37. <https://doi.org/10.1007/s10115-007-0114-2>

- Zamora Rojas, E. (2013). *Control no destructivo e in situ de productos y procesos en la industria del cerdo ibérico usando sensores espectrales de infrarrojo cercano*. [Tesis Doctoral, Universidad de Córdoba] <http://helvia.uco.es/xmlui/handle/10396/9965>
- Zamora-Rojas, E., Garrido-Varo, A., De Pedro-Sanz, E., Guerrero-Ginel, J. E., y Pérez-Marín, D. (2013). Prediction of fatty acids content in pig adipose tissue by near infrared spectroscopy: At-line versus in-situ analysis. *Meat Science*, 95(3), 503-511. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.05.020>
- Zamora-Rojas, E., Pérez-Marín, D., De Pedro-Sanz, E., Guerrero-Ginel, J. E., y Garrido-Varo, A. (2012). In-situ Iberian pig carcass classification using a micro-electro-mechanical system (MEMS)-based near infrared (NIR) spectrometer. *Meat Science*, 90(3), 636-642. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2011.10.006>
- Zareef, M., Chen, Q., Hassan, M. M., Arslan, M., Hashim, M. M., Ahmad, W., Kutsanedzie, F. Y. H., y Agyekum, A. A. (2020). An Overview on the Applications of Typical Non-linear Algorithms Coupled With NIR Spectroscopy in Food Analysis. *Food Engineering Reviews*, 12(2), 173-190. <https://doi.org/10.1007/s12393-020-09210-7>
- Zhang, Z., Pan, T., Sun, Y., Liu, S., Song, Z., Zhang, H., Li, Y., y Zhou, L. (2021). Dietary calcium supplementation promotes the accumulation of intramuscular fat. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 12(1), 94. <https://doi.org/10.1186/s40104-021-00619-6>
- Zubiri Gaitán, A. (2018). *Análisis metabólico no dirigido en dos líneas de conejos seleccionadas de forma divergente para grasa intramuscular Tesis* [Trabajo Fin de Máster]. Universidad Politécnica de Valencia y Universidad Autónoma de Barcelona.

V. COMPENDIO DE ARTÍCULOS /
COMPENDIUM OF ARTICLES

Artículo 1 / Article 1.

Título / Title: Prediction of stable isotopes and fatty acids in subcutaneous fat of Iberian pigs by means of NIR: A comparison between benchtop and portable systems. (*Predicción de isótopos estables y ácidos grasos en grasa subcutánea de cerdos ibéricos mediante NIR: Una comparación entre equipos de sobremesa y portátiles.*)

Autores / Authors: María Inmaculada González-Martín, Olga Escuredo, Miriam Hernández-Jiménez, Isabel Revilla, Ana M^a Vivar-Quintana, Iván Martínez-Martín, Pedro Hernández-Ramos

Revista / Journal: *Talanta* **2021**, **221**, 121817.

- (Elsevier) (Enviado: 27 de junio de 2020. Aceptado: 26 de octubre de 2020. Publicado online: 29 de octubre de 2020. Fecha de publicación: 1 de marzo de 2021).
- (Elsevier) (Submitted: 27 de June de 2020. Accepted: 26 October 2020. Published online: 29 October 2020. Publication date: 1 March 2021).

<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121817>

Índices de calidad / Quality indices:

Cuartil / Quartile: Q1

Área / Area: Chemistry, Analytical

Posición de la revista / Position of the journal: 11/87

Factor de impacto / Impact factor: 6.556 (2021)

Número de citas / Number of citations : 6 Google Scholar / 4 Web of Science (21 March 2023)

Resumen

La calidad de los productos derivados del cerdo ibérico depende de la genética, de la dieta que ha recibido el animal y de la tecnología de producción. La dieta en la última fase de cebo puede estar basada en piensos y/o en la montanera (consumo de bellotas y pastos al aire libre) dependiendo de la cual se puede producir un cambio significativo en el perfil lipídico de la grasa del animal, influyendo directamente sobre el perfil sensorial. La industria del sector ibérico persigue la búsqueda de técnicas analíticas que le permitan identificar la alimentación que recibió el animal. El cerdo al ser un animal monogástrico refleja en la grasa lo que ha comido, por lo que tradicionalmente la detección de prácticas fraudulentas en la dieta final de engorde de los animales se llevaba a cabo mediante el análisis del perfil lipídico por cromatografía de gases. Hoy en día existen otros análisis que permiten aportar información sobre la alimentación recibida por los animales. En el cerdo ibérico, la relación isotópica $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ de la grasa subcutánea expresado como $\delta^{13}\text{C}$ (‰) permite la reconstrucción de la dieta seguida por el animal, ya que esta relación depende de la proporción de material vegetal C4 y C3 consumido. Sin embargo, estos métodos de análisis son costosos y necesitan una compleja preparación de la muestra previa a su análisis. Por ello, otras técnicas como la espectroscopía en el infrarrojo cercano (NIRS) ha demostrado ser un método analítico fiable, económico, rápido y con alto potencial para ser aplicado en este contexto. Además, la evolución de la espectroscopía NIR en los últimos años ha llevado a desarrollar dispositivos portátiles que permiten implementarla en entornos industriales pudiendo hacer un seguimiento rutinario in situ en las cadenas de producción.

En el presente trabajo se evaluó el potencial de un dispositivo de infrarrojo cercano portátil (MicroNIR 1700 ES) con un rango de medida de 900-1700 nm para determinar la relación $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ y el porcentaje de ácidos grasos comparándolo con un equipo NIR de sobremesa (Foss NIR System 5000) con diferentes rangos de medida dependiendo de la presentación de la muestra y sonda utilizada: 1.100-2.000 nm para grasa sólida y sonda de fibra óptica y de 1.100 a 2500 nm para grasa extraída y sonda cam-lock. Previamente no se había intentado predecir con NIRS la relación $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ni la cantidad de algunos ácidos grasos presentes de forma minoritaria en grasa subcutánea. Los métodos de referencia utilizados fueron el análisis de isótopos estables mediante espectrometría de masas y el análisis de ácidos grasos mediante cromatografía de gases. Se analizaron 105 muestras de grasa subcutánea de cerdos ibéricos recogidas en el momento del sacrificio siendo 60 muestras de ibérico 100% puro y 45 muestras de cruces 50% ibérico-Duroc alimentados a base de bellota en la última fase de engorde (entre 68-120 días). Las muestras se analizaron sin manipulación previa (NIR portátil y de sobremesa con sonda de fibra óptica) y después de extraer la grasa mediante microondas (NIR de sobremesa con sonda cam-lock con un paso óptico de 0,1 nm).

En cuanto a los datos de referencia, se pudo observar un amplio rango de variación debido a la diferente pureza genética y a que los animales pasaron diferentes periodos en montanera. Los periodos más largos en régimen de montanera aumentaron el porcentaje de ácido oleico, linoleico y el valor absoluto de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) y también se observó un descenso del porcentaje de los ácidos grasos esteárico y linolénico.

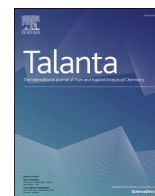
La predicción del valor $\delta^{13}\text{C}$ (‰) y del contenido en ácidos grasos se realizó por el método de regresión MPLS usando todo el rango espectral proporcionado por cada uno de los dispositivos y sondas. La dispersión que presentan los espectros fue tratada mediante suavizados y derivadas. En primer lugar, se llevó a cabo un análisis de componentes principales (PCA) para detectar outliers, reducir el número de variables y asignar las muestras al conjunto de calibración (80% del total de las muestras) y validación (20% restante). Las ecuaciones MPLS se obtuvieron mediante la validación interna cruzada de modo que el conjunto de valores de calibración se divide en una serie de subconjuntos que van alternando su presencia en el grupo de predicción y calibración repitiéndose el proceso para que todos los subgrupos hayan participado en predicción y calibración. Se obtuvieron así diferentes ecuaciones para cada componente, de modo que la elección de la mejor ecuación se basó en aquella con un mayor valor de R^2 (RSQ, coeficiente de correlación múltiple) y menor de RMSECV (Error de cross validación).

Los espectros medidos con el equipo de sobremesa sobre la grasa extraída han permitido obtener ecuaciones de predicción (valor de R^2 entre 0.97 - 0.50) para el valor de $\delta^{13}\text{C}$ (‰), el porcentaje de 16 ácidos grasos (ácido palmítico, C16:0; ácido palmitoleico, C16:1; ácido heptadecanoico, C17:0; cis-10 heptadecenoico, C17:1; ácido esteárico, C18:0; ácido oleico, C18:1; ácido transvaccénico, 18:1 n7; ácido linoleico, C18:2; ácido γ -linolénico, C18:3 n6; ácido α -linolénico, C18:3 n3; ácido eicosenoico, C20:1; ácido eicosapentaenoico, C20:5 n3; ácido heneicosanoico, C21:0; ácido erúrico C22:1; ácido docosadienoico C22:2 n6; ácido docosapentaenoico C22:5 n3) y los sumatorios de ácidos grasos según el grupo funcional (Σ de AGS, Σ de AGM y Σ de AGP tanto Σ n-3 como Σ n-6). En el caso de los espectros tomados mediante el mismo equipo y sonda de fibra óptica sobre la muestra de grasa intacta se obtuvieron las ecuaciones de predicción para $\delta^{13}\text{C}$ (‰), 13 de los 16 ácidos grasos calibrados con la toma de registros de grasa extraída y los sumatorios de ácidos grasos mencionados anteriormente (no fue posible calibrar el ácido heptadecanoico, C17:0; ácido eicosenoico, C20:1 y ácido erúrico C22:1). Ambos tipos de registro con el equipo de sobremesa mostraron buena capacidad de predicción obteniendo mejores valores en la grasa extraída debido a que tiene un rango espectral mayor (1.100-2500 nm) y a la mayor homogeneidad de la muestra. El registro de los espectros con el equipo portátil sobre muestras de grasa intacta han permitido obtener ecuaciones de predicción para el $\delta^{13}\text{C}$ (‰) y 12 ácidos grasos (palmítico C16:0; esteárico C18:0; oleico C18:1; y ácido linoleico C18:2, y otros ácidos grasos como C17:1, ácido transvaccénico, 18:1 n7, ácidos α -linolénico y γ -linolénico, ácido eicosenoico C20:1, ácido heneicosanoico C20:0, ácido docosadienoico C22:2 n6, ácido docosadienoico C22:5 n3) además de los sumatorios en función de las insaturaciones.

En la validación externa se aplicaron las ecuaciones seleccionadas sobre 20 nuevas muestras de grasa que no se utilizaron en el modelo de calibración para comprobar la solidez del método. Para todos los tipos de registro se comprobó que no existían diferencias significativas entre el dato predicho y el valor de referencia obtenido en el laboratorio.

Los resultados obtenidos confirman la capacidad de la tecnología NIR para la determinación de los valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰), del porcentaje de los ácidos grasos mayoritarios y de otros minoritarios, así como del sumatorio de AGS, AGM y AGP tanto n-3 como n-6. Además, el equipo portátil

proporcionó resultados comparables a los obtenidos con un equipo de sobremesa, por ello los equipos portátiles pueden ser una alternativa viable para el control cuantitativo in situ de parámetros de interés del cerdo ibérico.



Prediction of stable isotopes and fatty acids in subcutaneous fat of Iberian pigs by means of NIR: A comparison between benchtop and portable systems

María Inmaculada González-Martín^{a,*}, Olga Escuredo^b, Miriam Hernández-Jiménez^c, Isabel Revilla^c, Ana MA. Vivar-Quintana^c, Iván Martínez-Martín^c, Pedro Hernández-Ramos^d

^a Analytical Chemistry, Nutrition and Bromatology, University of Salamanca Calle Plaza de los Caidos s/n, Salamanca, 37008, Spain

^b Plant Biology and Soil Sciences. Faculty of Sciences, University of Vigo, As Lagoas, Ourense, 32004, Spain

^c Food Technology, University of Salamanca Escuela Politécnica Superior de Zamora, Avenida Requejo 33, Zamora, 49022, Spain

^d Graphic Expression in Engineering, University of Salamanca Escuela Politécnica Superior de Zamora, Avenida Requejo 33, Zamora, 49022, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Iberian pig
Subcutaneous fat
 $\delta^{13}\text{C}$
Fatty acids
Portable NIR
Benchtop NIR

ABSTRACT

The potential of a portable Near Infrared spectrophotometer compared with that of NIR benchtop equipment is assessed to determine the $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ relationship of stable isotopes and the fatty acid content. 105 samples of subcutaneous fat of Iberian pigs collected at the time of their slaughter have been analyzed. The analysis of stable isotopes and gas chromatography were the methods of reference used. The samples were analyzed without prior handling (portable and benchtop NIR) and after extracting the fat (benchtop NIR). The results show that with the portable equipment it is possible to determine $\delta^{13}\text{C}$ (‰), 12 fatty acids, and 5 summations of fatty acids (SFA, MUFA, PUFA, w3, and w6), while with the benchtop NIR equipment it is possible to measure $\delta^{13}\text{C}$ (‰), 16 fatty acids, and the 5 summations of fatty acids. The correlation coefficients of the portable equipment were slightly lower than those of the NIR benchtop equipment.

1. Introduction

The products deriving from the Iberian pig (ham and shoulder) are highly appreciated by consumers for their organoleptic and gastronomic quality. Although this quality depends on the genetics of the pig, what it eats, and the technology used in the production [1,2], various authors have shown that the factor with the greatest influence is its food [3]. Therefore, depending on whether the diet is based on fodder or on montanera (the consumption of acorns and grass by free grazing) a significant change occurs in the profile of the fatty acids of the fat of Iberian pigs [4]. The industries of the Iberian sector have implemented programs for controlling the fatty acids of subcutaneous fat as an indicator of the diet followed by the animal during the montanera. The importance for the sector lies in the fact that the fatty acid composition has a considerable influence on the sensory profile [5]. However, the existence of fraudulent practices such as complementing the final fattening diet of Iberian pigs with commercial foods which imitate the composition of montanera means that it is important to determine the composition of fatty acids rapidly and reliably. The analysis of the

profile of fatty acids (FA) has traditionally been carried out by means of gas chromatography; however, near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) has shown its potential for predicting the composition of fatty acids in adipose tissue, extracted fat, or rendered fat of Iberian pigs [6–8].

On the other hand, the carbon isotope composition can also provide information on the animal feed. The $\delta^{13}\text{C}$ value of cattle was found to be highly dependent on their diet composition, particularly with regard to the proportion of C4 and C3 plant material [9]. By using the stable isotopes of C, H, N, O, and S and isotopes of Sr and B in different food products of both animal and plant origin it is possible to ascertain the origin, diet, and production system [10,11]. In the case of the Iberian pig (a monoviviparous animal), the $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ isotope relationship expressed as $\delta^{13}\text{C}$ (‰) shown in its subcutaneous fat allows the reconstruction of the diet followed by the animal. Various studies have therefore shown that it is possible to distinguish Iberian pigs fed on acorns from those fed another kind of diet (mixed and raised) [12–14]. Moreover, stable isotopes of carbon ($\delta^{13}\text{C}$) and sulfur ($\delta^{34}\text{S}$) in liver samples allow the distinguishing of the diet received by the pigs during fattening (acorns or

* Corresponding author.

E-mail address: inmaglez@usal.es (M.I. González-Martín).

<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121817>

Received 27 June 2020; Received in revised form 22 October 2020; Accepted 26 October 2020

Available online 29 October 2020

0039-9140/© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

fodder) and also of their breed (Iberian or white). The analysis of stable isotopes of H, C, N, O, and S in cured hams from Italy and Spain with different genetics and production systems has allowed the distinguishing of geographical origin and is considered to be a potentially useful method for determining also the production system [15]. The use of the relationship of $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ isotopes of strontium and the analysis of 34 trace elements allows the distinguishing of the geographical origin (Spain or Italy) of the hams studied (Iberian, Bayona, Parma, and San Daniele) and the processing practices with the salt content, although it is considered that more detailed study is necessary [16]. It should be emphasized that the analysis of stable isotopes of carbon is an expensive method which is hard to access for researchers and Iberian pig companies.

Given the complexity of the processes related to the Iberian pig, rapid and decisive methods are sought. In this sense near infrared spectroscopy (NIR) has been shown to be a reliable, cheap, and rapid analytical method. Within the products deriving from the pig both in muscle and in fat, infrared spectroscopy has been used to determine the fatty acid profile [8,17,18], in the authentication of the fattening diet of the pigs [19–21], and combined with a PLS analysis to predict defects in serrano ham among others [22,23]. Studies of NIR technology for the prediction of stable isotopes have not been found. The recent development of portable devices which allow the establishing of NIRS technology in industrial environments means that they have great potential as an in situ control tool and for routine monitoring along value chains in real time. Examples of this include applications to agrofood products [24], dairy products and cheeses [25,26], soils [27], or delicate revisions of spectroscopy techniques with portable instruments [28]. In the matter which concerns us, portable NIRs are being used with great potential in the meat sector in aspects related to product quality and safe [29,30]. In the sector of the Iberian pig in particular, portable instruments coupled to optic fiber have been used to calibrate four of the main fatty acids in live animals, in carcasses at the abattoir, in subcutaneous fat (with and without skin), and in transverse sections [31]. However, the equipment has its limitations regarding cost, time, weight, and a lack of sensitivity.

Other portable equipment, the so called micro-electro-mechanical system (MEMS)-NIRS, has been applied to Iberian pig carcasses at the abattoir in order to classify the animals according to their food type ("Acorn", "Mixed Acorn and Fodder", and "Fodder") [20]. More recently it has been applied to fresh meat and subcutaneous fat to achieve a discrimination rate of 75% according to the four official categories for Iberian pig carcasses (Black, Red, Green, or White Label) [32]. When the results obtained by the (MEMS)-NIRS equipment, which operates in the area of the 1600–2400 nm spectrum with data every 8 nm, are compared with those obtained by high-resolution NIRS monochromators, which operate in the 400–2500 nm margin with data every 2 nm, it can be concluded that the results for the four main fatty acids are acceptable for the Iberian pork industry [33]. Despite these results, some studies Pérez-Marín & Garrido-Varo [34] on the potential of NIRS for the in situ analysis of ham from the Iberian pig, and on the use of sensors to ensure robust traceability, indicate that these are matters which still need to be debated. This study compares the results of the prediction of stable isotopes and of up to 16 fatty acids together with the summation of saturated, monounsaturated, and polyunsaturated fatty acids, w3, and w6 in subcutaneous fat of the Iberian pig, using two systems in order to do so. These are on the one hand portable NIR equipment in the area of the spectrum from 900 to 1700 nm and on the other benchtop NIR equipment with the area of the spectrum from 1100 to 2500 nm.

2. Material and methods

2.1. Samples

105 samples of subcutaneous fat were taken from Iberian pigs at the time of slaughter: 60 samples of 100% pure Iberian and 45 samples of 50% Iberian-Duroc crossbreeds from the 2018–2019 slaughtering

season. The animals analyzed had been fed by means of the *montanera* system (consumption of acorns and grass) for periods of between 68 and 120 days. The samples of subcutaneous fat were collected when the animal was slaughtered from the coccyx including the skin along the full depth of the subcutaneous fat of the animal with all the accumulations of fat. Analyses of stable isotopes, the composition of the fatty acid profile, and NIR calibration were carried out on these samples. Las muestras se mantienen congeladas siempre a -30°C hasta el momento de la medida.

2.2. Determination of stable isotopes

The skin was removed from the subcutaneous fat sample, the latter was ground up, and some 10 g were homogenized with a Polytron blender. The homogenized samples were kept frozen at -28°C until use. The samples were analyzed for ^{13}C using a HCNOS EURO EA 3000 elemental analyzer with a system of combustion at high temperature and a system of dilution connected to a mass spectrometer with a gaseous source in continual flow for the determination of relationships of stable isotopes, model ISOPRIME; made by Micromass. The ^{13}C natural abundance was expressed in ^{13}C units using the international PDB standard: $\delta^{13}\text{C} = [({}^{13}\text{R}_{\text{sample}}/{}^{13}\text{R}_{\text{standard}}) - 1]1000$, where ${}^{13}\text{R} = {}^{13}\text{C}/{}^{12}\text{C}$. The National Bureau of Standards supplies NBS-21 graphite with a $\delta_{\text{PDB}}^{13}\text{C}$ of 0–28.10‰. It should be noted that the precision (2σ) of CO_2 measurement on a double-beam spectrometer is 0.05.

2.3. Determination of fatty acids

The quantification of fatty acids by means of gaseous chromatography (GC) of the fat extracted from the subcutaneous fat by microwaves (at a power of 1200 W and using position defrosting) [8]. The fatty acids (FA) of all samples were methylated and analyzed by gas chromatography (6890 N gas chromatograph (GC)); Agilent Technologies, Santa Clara, CA), using a SP-2560 capillary column (Supelco, Bellefonte, PA) according to the method described by Lurueña-Martínez et al. [35]. For these samples, 1 μL was injected into the gas chromatograph using a split (20:1). The different FA were identified by their retention times, comparing them with the standard mix (47885-U Supelco, Sigma-Aldrich, Germany) and their contents were calculated using chromatogram peak areas and were expressed as percentages (%) of the total FA (fatty acids) analyzed.

2.4. NIRS measurements

Samples of subcutaneous fat were analyzed by using NIRS instruments: benchtop Foss NIR System 5000 equipment (Hillerod, Denmark) with a standard 1.5 m 210/210 bundle fibre-optic probe (Ref. no R6539-A), and a portable MicroNIR Pro v2.5 equipment (MicroNIR 1700 ES, VIAVI, Santa Rosa, California, USA). The benchtop equipment includes a probe employs with a remote reflectance system and a ceramic plate as reference. The quartz window (with 5 cm \times 5 cm surface area) allows the measuring of reflectance in the NIR zone close to 1100–2000 nm. It takes 30 min of warm-up for the portable NIR equipment and 1 h for the benchtop equipment. The measurement of the registry was carried out by applying directly with the probe on intact untreated sample of subcutaneous fat. Extracted subcutaneous fat samples also were analyzed (with total lipid extracts in microwaves). For these liquid samples, 15 μL of extracted fat into cam-lock were used (circular capsules with an optic path length of 0.1 nm) in NIR registers. Measurements were carried out in reflectance mode between 1100 and 2498 nm. The spectra were recorded at intervals of 2 nm, performing 32 scans for both the reference and samples.

Acquisition of spectra data using a portable MicroNIR spectrophotometer was performed with an instrument designed to measure diffuse reflectance in the NIR region of the electromagnetic spectrum. The MicroNIR equipment uses a linear variable filter (LVF) as the dispersing element. As a result of the varying film thickness, the wavelength

transmitted through the filter varies linearly in the direction of the wedge. The LVF is coupled to a linear detector array (128-pixel uncooled InGaAs photodiode array). The ultra-compact spectroscopic engine is coupled with a tungsten lamps diffuse illumination system. The measuring of reflectance in the NIR zone close was 900–1700 nm, and at intervals of 6 nm in the spectra was recorded. The intact subcutaneous fat was measured directly with an adapter coupled to the system NIR. Spectra were recorded using the instrument acquisition software MicroNIR™ Pro v.2.2 (VIAVI, Santa Rosa, California, USA). The portable equipment used a Spectralon® ceramic tile as a white reference (100% reflectance) of politetrafluoroetilen (~99%). A reference measurement was performed on the MicroNIR approximately 20 min after the lamps were turned on and every hour thereafter while performing scans. A 99% diffuse reflectance panel was used for the 100% reference value, and the 0% reference value was taken by leaving the tungsten lampson with an empty support (known as dark Current Scan). Mean temperature on measurement ranged from 21 ± 1 °C. La obtención de los registros NIR tardan 2 minutos. Tratamos de minimizar los errores del muestreo. La razón, el cerdo ibérico refleja en su grasa subcutánea la alimentación recibida a lo largo del tiempo (y con eso la composición en ácidos grasos y $\delta^{13}\text{C}$), así los acumulos de grasa más próximo a la piel, corresponden a su última alimentación. Se realizan 3 registros NIR y en cada registro se toman 32 puntos diferentes de la zona de 5cmx5 cm, dando lugar a un espectro medio. El proceso se repite 3 veces y se acepta el espectro medio, si no hay diferencias superiores a H (cte de Mahalanobis). Fig. 1 shows the 3 spectra obtained with the 3 types of register. The diffuse reflectance signal of the NIR spectrum expressed as $\log(1/R)$ (R = reflectance). The software used for data manipulation and chemometric analysis was Win ISI 1.50 installed on a Hewlett-Packard Pentium III computer. To develop the models 85 samples were taken in the calibration group and 20 samples in that of external validation, dividing the samples of subcutaneous fat into the two groups at random.

2.5. Statistical analyses for NIR

Sample spectra were pre-processed using a principal component

analysis (PCA) to select samples for allocation in either the calibration or validation set and to detect outliers. The number of variables is reduced by principal component analysis (PCA) [36]. A sample with H statistic ≥ 3.0 standardized units from the mean spectrum is defined as a global H outlier and is eliminated from the calibration set. The calibration process was implemented with the spectra of the resulting samples and their chemical data. Using the $T \geq 2.5$ criterion, samples that presented high residual values when they were predicted were eliminated from the set. The statistical parameters of the calibration were obtained for each of the components after removing the samples for spectral (H criterion) or chemical (T criterion) reasons. Anomalous spectra were determined by applying the Mahalanobis distance because the risk of there being mistakes in the equations under practical conditions is very low or practically non-existent when the standardized H -statistic (Mahalanobis distance) is used during the routine analysis of unknown samples. This tells us how different the spectrum of the unknown sample is from the average spectrum in the calibration set. Samples with an H -value greater than three may be considered as not belonging to the population from which the equations were developed. Moreover, using the $T \geq 2.5$ criterion, samples that were different from the population owing to chemical criteria were removed from the set. The quantification of the $\delta^{13}\text{C}$ (‰) and fatty acids was performed by the MPLS regression method [37]. MPLS is often more stable and accurate than the standard PLS algorithm. In MPLS the NIR residuals at each wavelength, obtained after each factor has been calculated, are standardized (by dividing the standard deviations of the residuals at each wavelength) before calculating the next factor. All the spectral information (1100–2000 nm) is used when the remote reflectance fiber-optic probe (intact samples) is also used, and 1100 and 2498 nm when the NIR spectrum is obtained with the cam-lock cells and the fat extract, and between 900 and 1700 nm when portable NIR equipment is registered. To minimize the undesired contributions present in the NIR signals different spectral pretreatments were used: derived and smoothed. The effects of scattering were removed using multiplicative scatter correction (MSC), standard normal variate (SNV), detrend (DT), or SNV-DT and combinations of these [38]. Moreover, mathematical treatments, derivatives, gap in derivatives, and

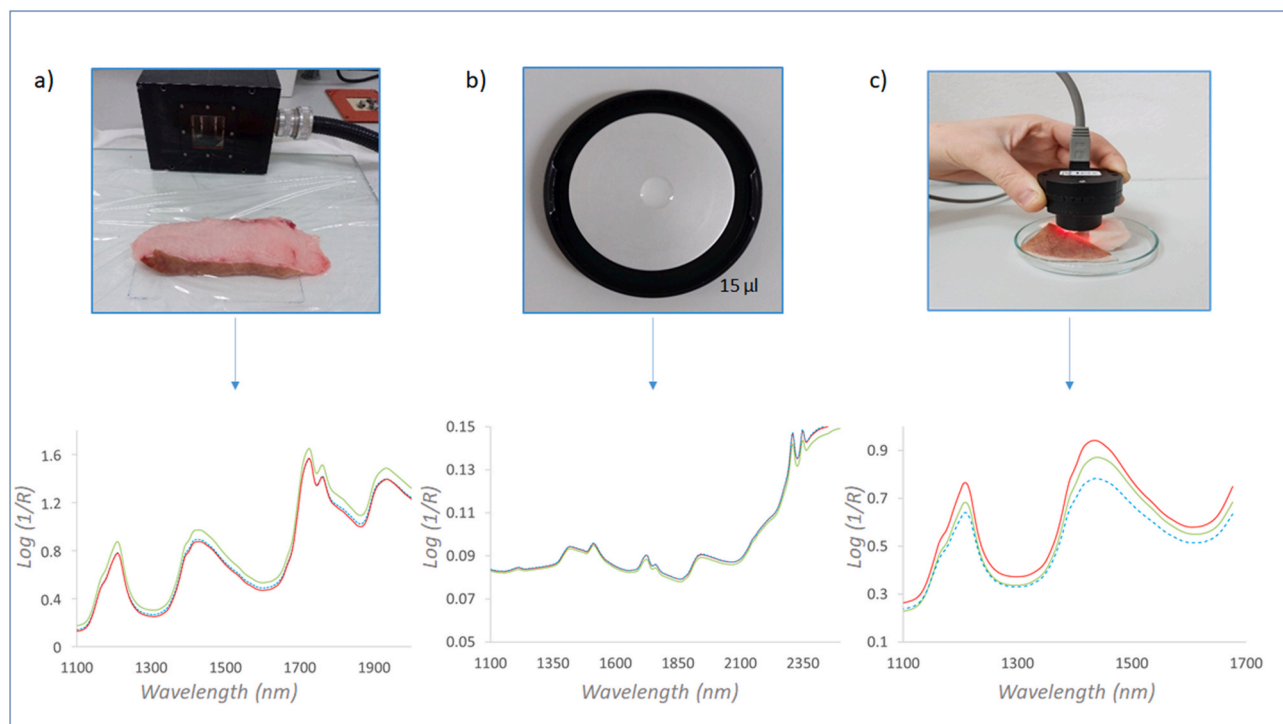


Fig. 1. FNIR measurements: (a) Foss NIR System 5000 with a fibre-optic probe. Samples of intact subcutaneous fat. (b) Foss NIR System 5000 with a Cam-lock probe. Samples of extracted subcutaneous fat and (c) MicroNIR Pro v2.5. Samples of intact subcutaneous fat.

smoothing were carried out. When developing MPLS equations, cross-validation is recommended in order to select the optimum number of factors and to avoid overfitting [39]. For cross-validation the calibration set is divided into several groups. Each group is then validated using calibration developed on the other samples. Finally, validation errors are combined into a standard error of cross-validation (RMSECV). It has been reported that RMSECV is the best single estimate for the prediction capability of the equation. This statistic is similar to the average standard error of prediction (RMSEP) from ten randomly chosen prediction sets [39]. The number of cross-validation groups was 8 for the intact subcutaneous fat samples, 7 for the samples of extracted fat using the register of the benchtop NIR equipment, and 8 for the samples registered with the portable equipment. The ratio of performance to deviation (RPD) is the relation between SD and RMSEC, and it is desired to be larger than 2 for a good calibration [40]. The statistics used to select the best equations were R squared (RSQ, multiple correlation coefficients) and RMSECV.

3. Results and discussion

3.1. Values of reference

The results of the ¹³C/¹²C relationship of stable isotopes, expressed as δ¹³C (‰) of the subcutaneous fat (at the time of slaughter), and of the 30 quantified fatty acids together with the totals of fatty acids by functional groups (SFA, MUFA, PUFA, w3 and w6) are shown in Table 1. It can be appreciated that the components determined show a wide range of variation owing to the fact that the animals spent different periods on the *montanera* and to different breeds. As the time on the *montanera* is

Table 1
Composition of δ¹³C and fatty acids in the 105 samples of subcutaneous fat of Iberian pigs used as a reference.

Constituent	Minimum	Maximum	SD
C12:0	0.04	0.08	±0.01
C14:0	0.76	1.36	±0.12
C14:1 n5	0.00	0.13	±0.01
C15:0	0.03	0.13	±0.02
C16:0	15.28	22.39	±1.52
C16:1	1.47	2.83	±0.28
C17:0	0.19	0.48	±0.05
C17:1	0.02	0.49	±0.06
C18:0	6.00	12.39	±1.40
C18:1 n9	0.00	0.28	±0.03
C18:1	48.57	58.57	±1.99
C18:1 n7	0.00	2.81	±0.39
C18:2 n6t	0.01	0.16	±0.02
C18:2 n6	6.77	11.92	±1.01
C20:0	0.00	0.22	±0.03
C18:3 n6	0.03	0.29	±0.07
C18:3 n3	0.41	1.37	±0.16
C20:1 n9	1.14	2.17	±0.19
C21:0	0.00	0.17	±0.04
C20:2 n6	0.00	0.06	±0.01
C22:0	0.00	0.05	±0.01
C20:3 n6	0.00	0.05	±0.01
C22:1 n9	0.47	0.84	±0.08
C20:3 n3	0.01	0.05	±0.01
C20:4 n6	0.00	0.12	±0.03
C23:0	0.02	0.12	±0.03
C22:2 n6	0.00	0.29	±0.09
C20:5 n3	0.00	0.27	±0.06
C22:5 n3	0.02	0.19	±0.05
C22:6 n3	0.04	0.09	±0.01
AGS	23.92	36.72	±2.77
AGM	54.25	64.49	±1.91
AGP	8.03	14.06	±1.14
w3	0.76	1.85	±0.20
w6	7.21	12.21	±0.97

SD: Standard Deviation.

Table 2
NIR calibration statistics of δ¹³C and fatty acids in subcutaneous fat of Iberian pigs by means of benchtop NIR equipment. Samples of Intact Subcutaneous Fat (ISF) and extracted subcutaneous fat (ESF).

Constituent	N	Treatment		Mean		Est. Min- Est. Max		SD		RMSEC		RPD		RMSEP		RSQ	
		ESF	ISF	ESF	ISF	ESF	ISF	ESF	ISF	ESF	ISF	ESF	ISF	ESF	ISF	ESF	ISF
δ ¹³ C	83	83	83	-24.95-27.56	-24.85-27.58	0.44	0.46	0.15	0.21	2.90	2.16	0.25	0.22	0.88	0.79		
C16:0	83	81	81	14.42-23.36	14.28-23.42	1.49	1.52	0.36	0.36	4.15	4.22	0.41	0.41	0.94	0.94		
C16:1	83	85	85	1.36-2.97	1.35-2.96	0.27	0.27	0.15	0.16	1.79	1.72	0.16	0.16	0.69	0.66		
C17:0	84	84	84	0.14-0.40	0.14-0.40	0.04	0.04	0.03	0.03	1.42	1.42	0.03	0.03	0.50	0.50		
C17:1	83	83	83	0.12-0.42	0.12-0.42	0.05	0.05	0.03	0.03	1.88	1.56	0.03	0.03	0.72	0.59		
C18:0	81	81	81	4.61-12.46	4.65-12.21	1.31	1.26	0.29	0.45	4.59	2.80	0.37	0.44	0.95	0.87		
C18:1	83	83	83	47.80-59.99	48.00-59.78	2.03	1.96	0.49	0.73	4.16	2.68	0.69	0.79	0.94	0.86		
C18:1 n7	86	83	83	0.84-2.86	0.91-2.82	0.34	0.32	0.24	0.21	1.42	1.50	0.32	0.22	0.50	0.56		
C18:2	82	85	85	6.27-11.46	6.05-11.79	0.86	0.96	0.19	0.33	4.65	2.90	0.37	0.34	0.95	0.88		
C18:3 n6	84	82	82	0.00-0.35	0.00-0.36	0.07	0.07	0.02	0.03	3.38	2.25	0.02	0.03	0.91	0.80		
C18:3 n3	82	84	84	0.33-1.08	0.32-1.10	0.13	0.13	0.03	0.06	4.17	2.06	0.06	0.07	0.94	0.76		
C20:1	85	85	85	1.06-2.03	1.06-2.03	0.16	0.16	0.06	0.06	2.66	2.66	0.16	0.16	0.86	0.86		
C20:5 n3	79	80	80	0.02-0.31	0.02-0.31	0.05	0.05	0.01	0.02	4.52	2.17	0.02	0.02	0.95	0.79		
C21:0	84	82	82	0.01-0.22	0.01-0.22	0.04	0.04	0.01	0.01	2.59	2.57	0.02	0.02	0.85	0.85		
C22:1	85	85	85	0.42-0.83	0.42-0.83	0.07	0.07	0.04	0.04	1.99	1.99	0.04	0.04	0.75	0.75		
C22:2 n6	80	76	80	0.00-0.36	0.00-0.36	0.09	0.09	0.03	0.03	3.53	3.03	0.03	0.04	0.92	0.89		
C22:5 n3	85	80	80	0.00-0.24	0.00-0.24	0.05	0.05	0.01	0.02	4.53	2.17	0.01	0.02	0.93	0.85		
SFA	83	81	81	20.93-37.55	20.93-37.31	2.77	2.73	0.48	0.54	5.81	5.10	1.33	0.54	0.97	0.96		
MUFA	83	83	83	54.62-66.04	54.81-66.06	1.90	1.88	0.51	0.87	3.74	2.14	0.6	0.85	0.93	0.78		
PUFA	82	85	85	7.46-13.24	7.30-13.41	0.96	1.02	0.20	0.31	4.73	3.25	0.43	0.30	0.94	0.91		
w3	84	82	82	0.55-1.58	0.52-1.61	0.17	0.18	0.04	0.09	3.96	2.03	0.05	0.10	0.94	0.76		
w6	83	84	84	6.60-12.13	6.57-12.13	0.92	0.93	0.19	0.32	4.80	2.89	0.28	0.32	0.96	0.88		

Est. Min: estimated minimum. Est. Max: Estimated maximum. SD: Standard Deviation. RMSEP: Standard Error of Prediction. RSQ: multiple correlation coefficient. RPD: Ratio performance deviation: SD_{REF}/SEC.
^a Nondetermined

increased a significant rise in the absolute value of $\delta^{13}\text{C}$ (‰) can be observed. This is because feeding with acorns and grass conditions the $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ isotope relation on corresponding with foods with C3 plants. On the other hand, as the time on the *montanera* is increased the oleic and linoleic acid contents rise while those of stearic and linolenic acid fall [4]; the relationships which include them are therefore also altered. Another source of variation is the fact of including animals with different genetics (50% and 100% Iberian) as back-fat from purebred Iberian pigs had significantly higher percentages of monounsaturated fatty acids (MUFA) and significantly smaller percentages of polyunsaturated fatty acids (PUFA) than those from crossbred pigs [41].

3.2. Calibration equations of $\delta^{13}\text{C}$ (‰) and fatty acids

Table 2 shows jointly the calibration descriptors of $\delta^{13}\text{C}$ (‰) and fatty acids when the benchtop NIR equipment and the two forms of register are used, intact subcutaneous fat (using the spectra obtained with the remote reflectance fiber-optic probe) and in the extracted fat samples (using the spectra obtained with the cam-locks), showing as N the number of samples which have been used in the model developed after the elimination of samples owing to spectral criteria (H) or chemical criteria (T), and the results of the descriptors applying the best mathematical treatment. The NIR equations allow the determination of $\delta^{13}\text{C}$ (‰) and 16 fatty acids, Σ saturated, Σ monounsaturated, Σ polyunsaturated fatty acids, w3 and w6 in samples of extracted fat, palmitic acid, C16:0; palmitoleic acid, C16:1; heptadecanoic acid, C17:0; cis-10 heptadecen, C17:1; stearic acid, C18:0; oleic acid, C18:1; trans-vaccenic acid, 18:1 n7; linoleic acid, C18:2; γ -linolenic acid, C18:3 n6; α -linolenic acid, C18:3 n3; eicosenoic acid, C20:1; eicosapentaenoic acid, C20:5 n3; heneicosanoic acid, C21:0; erucic acid C22:1; docosadienoic acid C22:2 n6; DPA C22:5 n3; Σ of saturated, Σ of monounsaturated and Σ of polyunsaturated fatty acids together with w3 and w6. In contrast, in the case of intact samples $\delta^{13}\text{C}$ (‰) and 13 of the 16 previous fatty acids are determined as good calibration values for the minority acids C17:0; C20:1; and C22:1, together with all the summations of fatty acids, were not achieved. If we observe the data in Table 2 it can be seen that the NIR calibration descriptors are good in both the samples of subcutaneous fat registered intact with fiber-optic probe and in those registered in the form of extracted fat with the cam-lock cells. The mathematical models developed for the determination of $\delta^{13}\text{C}$ (‰) and of the different fatty acids can be highlighted; they show similar margins of application and standard deviations for both forms of presentation and are comparable with the results obtained by isotope ratio mass spectrometry (IRMS) for $\delta^{13}\text{C}$ (‰) and by gas chromatography for

fatty acids (Table 2). When intact samples are used the RMSEC values are slightly higher and the RMSEP values slightly lower than those of the samples of extracted fat. The RSQ values of minority fatty acids in intact samples are lower than those of the samples extracted, but always with useful values for applying the models to unknown samples. The benchtop NIR equipment showed a good prediction capacity ($\text{RPD} > 2$) for both intact and extracted fat, excepting for some minority fatty acids such as C16:1, C17:1, C22:1. The RPD values for $\delta^{13}\text{C}$ and fatty acids were always higher when the prediction was performed on extracted fat with benchtop NIR equipment (Tables 2 and 3).

Particularly novel is the determination by NIR of the $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ isotope relationship expressed as $\delta^{13}\text{C}$ (‰) in both samples of extracted fat and intact samples of subcutaneous fat, given the importance of this parameter and the cost to potential users. On the other hand, although in the bibliography it is possible to find determination by means of NIR spectroscopy of the majority fatty acids C16:0; C18:0; C18:1; C18:2, and C20:1, Σ SFA, Σ MUFA, and Σ PUFA no references have been found for the remainder of the fatty acids quantified in this study [8,32,42].

When the benchtop NIR equipment is used, MicroNIR Pro v2.5 applied to the samples of intact subcutaneous fat, the calibration descriptors given in Table 3 are obtained. In this table it can be observed that it is possible to quantify parameters such as $\delta^{13}\text{C}$ (‰) and 12 fatty acids such as palmitic C16:0; stearic C18:0; oleic C18:1; and linoleic acids C18:2, and other fatty acids such as C17:1, trans-vaccenic acid, 18:1 n7, α -linolenic and γ -linolenic acid, eicosenoic acid C20:1, heneicosanoic acid C20:0, docosadienoic acid C22:2 n6, DPA C22:5 n3, Σ saturated, Σ monounsaturated and Σ polyunsaturated fatty acids together with Σ w3 and Σ w6. Fatty acids such as palmitic, stearic, oleic, and linoleic acid were determined by using other portable NIR equipment as has been indicated in the introduction, but neither the remainder of the acids nor the summations of the various types of fatty acids [31,32]. The NIR regression models are justified by using the correlation between the concentration of each quantified parameter and the measuring at different wavelengths in accordance with the equation $y = \beta_0 + \beta_1 X_{\lambda_1} + \beta_2 X_{\lambda_2} + \beta_3 X_{\lambda_3} + \dots + \beta_n X_{\lambda_n}$, in which β refers to the coefficients and $X_{\lambda_1}, X_{\lambda_2}, X_{\lambda_3}, \dots, X_{\lambda_n}$, to the wavelengths where there is a correlation. La información espectral de los ácidos grasos viene definida por una serie de bandas de absorción que de acuerdo con la bibliografía [33,42–45] corresponden a la C–H bond, which is a fundamental constituent of fatty acid molecules, absorbs strongly at wavelengths close to 1200, 1400, 1750, 2310 and 2340 nm. Se presentan ligeras diferencias en nuestro trabajo, dependiendo de la forma de registro y el equipo, pues generalmente derivan de combinaciones C–H con otros modos vibracionales [46]. Así, la banda observada a 1724 nm se relaciona con el

Table 3

NIR calibration statistics of $\delta^{13}\text{C}$ and fatty acids in subcutaneous fat of Iberian pigs by means of portable NIR equipment.

Constituent	N	Treatment	Mean	Est. Min	Est. Max	SD	RMSEC	RPD	RMSEP	RSQ
$\delta^{13}\text{C}$	81	Dentrend only 2,4,4,1	-26.23	-24.93	-27.54	0.44	0.24	1.83	0.24	0.69
C16:0	80	Dentrend only 2,4,4,1	18.83	14.31	23.35	2.00	0.51	3.92	0.48	0.88
C16:1	83	Standard MSC 2,4,4,1	2.16	1.33	2.98	0.27	0.18	1.50	0.17	0.55
C17:1	78	SNV only 2,4,4,1	0.27	0.13	0.41	0.05	0.03	1.67	0.03	0.52
C18:0	78	SNV only 2,8,6,1	8.46	4.39	12.54	1.00	0.41	2.44	0.39	0.91
C18:1	81	SNV only 2,4,4,1	53.91	47.96	59.86	2.00	0.85	2.35	0.80	0.82
C18:2	81	Dentrend only 2,4,4,1	8.96	6.10	11.82	0.95	0.30	3.17	0.29	0.90
C18:3 n3	79	Dentrend only 2,4,4,1	0.71	0.31	11.14	0.13	0.06	2.17	0.06	0.79
C18:3 n6	80	None 2,4,4,1	0.16	0.00	0.35	0.06	0.03	2.00	0.03	0.77
C20:1	76	Dentrend only 2,4,4,1	0.16	0.02	0.31	0.05	0.02	2.50	0.02	0.78
C21:0	80	Standard MSC 2,4,4,1	0.11	0.007	0.22	0.04	0.02	2.00	0.02	0.75
C22:2 n6	72	SNV only 2,4,4,1	0.08	0.00	0.37	0.10	0.06	1.67	0.06	0.86
C22:5 n3	80	SNV only 2,4,4,1	0.10	0.00	0.24	0.05	0.02	2.50	0.02	0.77
SFA	80	Dentrend only 2,4,4,1	29.22	20.85	37.58	3.00	0.68	4.41	0.64	0.94
MUFA	81	None 1,4,4,1	60.38	54.55	66.21	2.00	0.80	2.50	0.75	0.83
PUFA	77	Standard MSC 2,4,4,1	10.40	7.38	13.41	1.00	0.30	3.33	0.28	0.91
w3	77	None 2,4,4,1	1.06	0.52	1.61	0.18	0.08	2.25	0.07	0.80
w6	81	None 2,4,4,1	9.36	6.58	12.13	0.94	0.30	3.13	0.28	0.89

Est. Min: estimated minimum. Est. Max: Estimated maximum. SD: Standard Deviation. RMSEC: Standard Error of Calibration. RMSEP: Standard Error of Prediction. RSQ: multiple correlation coefficient. RPD: Ratio performance deviation: $\text{SD}_{\text{REF}}/\text{SEC}$.

enlace C=O en los lípidos, a esa longitud de onda, para el ácido oleico en grasa extraída el valor de β es muy elevado, 6519.9, que justificaría la mejor calibración de este parámetro en grasa extraída, en comparación con la obtenida en muestras intactas. Resultados similares a los encontrados por otros autores [33,47], que observan que la banda 1720–1730 aumenta cuando lo hace la insaturación en los ácidos grasos; además de producirse un desplazamiento a longitudes de onda mas larga cuando aumenta la longitud de la cadena. A 2380 nm, zona del espectro NIR que corresponde a las bandas de combinación C–H de los ácidos grasos [42, 44], existe correlación, entre otros, para el ácido alfa linolenic, con un valor de β de 472.4 en muestras de grasa extraída, que justifica la calibración en este tipo de muestras.

Si hacemos referencia a los los modelos de calibración obtenidos para $\delta^{13}\text{C}$ nos encontramos que en la zona del espectro registrada únicamente con el equipo portátil (de 908 nm a 1100 nm) a 1000 nm presenta valores β de 168, correspondientes al second overtone de NH_2 , –NH de secondary amines y a 1069 nm, con valores de β , de 153,5, correspondientes a – CONH_2 primary amides [48]; que podrían estar relacionados con la alimentación de los cerdos en montanera (bellota, hierba). Cuando buscamos correlaciones de $\delta^{13}\text{C}$ con la sonda de fibra óptica, de nuevo se encuentra correlaciones fuertes a 1356 nm y valores de β de 2218, relacionados con combinación de grupos – CH_3 methyl, a 1532 nm con β de 1161 (correspondientes a enlaces N–H stretch y first overtone de enlaces R– NH_2 [44]) y a 1820 nm con valores de β de 1281. Todas estas correlaciones justifican la determinación del parámetro $\delta^{13}\text{C}$ en muestras de grasa subcutánea.

También resulta interesante comprobar que en la zona del espectro obtenido con el equipo portátil entre 1010–1100, se obtienen coeficientes β para los Σ monounsaturated, Σ saturated, Σ polyunsaturated fatty acids de 574, 537 y 143, correspondientes a los grupos – CH_3 combination y CH_2 combination [48].

This will justify the fact that the NIR spectra obtained with extracted fat where the area of the spectrum is wider (1100–2498) show improved correlations with the parameters under study than those obtained with intact subcutaneous fat with a fiber-optic probe register, the spectrum area of which is of 1100–2000 nm. Furthermore, the results obtained with the benchtop equipment, the RSQ values, are slightly lower than those achieved with other forms of register.

3.3. Internal and external validation

The internal assessment of NIR calibration models is estimated by cross-validation. In this method the set of calibration values is divided into a series of subsets. The number of cross-validation groups found by using the benchtop NIR equipment register was 8 in the intact samples of subcutaneous fat and 7 for the extracted fat samples, and for the samples registered with the portable equipment 8 in the case of the intact subcutaneous fat samples. From these a subgroup is taken for prediction and the remainder for calibration, repeating the process so that all the subgroups have passed through prediction and calibration. For all the constituents calibrated by means of MPLS with the benchtop NIR equipment (Table 2) and portable NIR equipment (Table 3), the standard errors of prediction (RMSEP) can be seen in Tables 2 and 3 together with the calibration parameters, the margin of application, the RSQ, and the standard error of calibration (RMSEC). It can be observed that the prediction errors are of the same type as those of calibration (RMSEC), which is an indicator that the NIR models obtained are suitable. The comparison of the NIR data obtained by means of the mathematical models and the reference data for $\delta^{13}\text{C}$ (‰) and some fatty acids are presented in Fig. 2. We provide as a comparison the internal validation graphs for the parameters $\delta^{13}\text{C}$ (‰), oleic acid C18:1, linoleic acid C18:2, and α -linolenic acid, both intact subcutaneous fat in the two

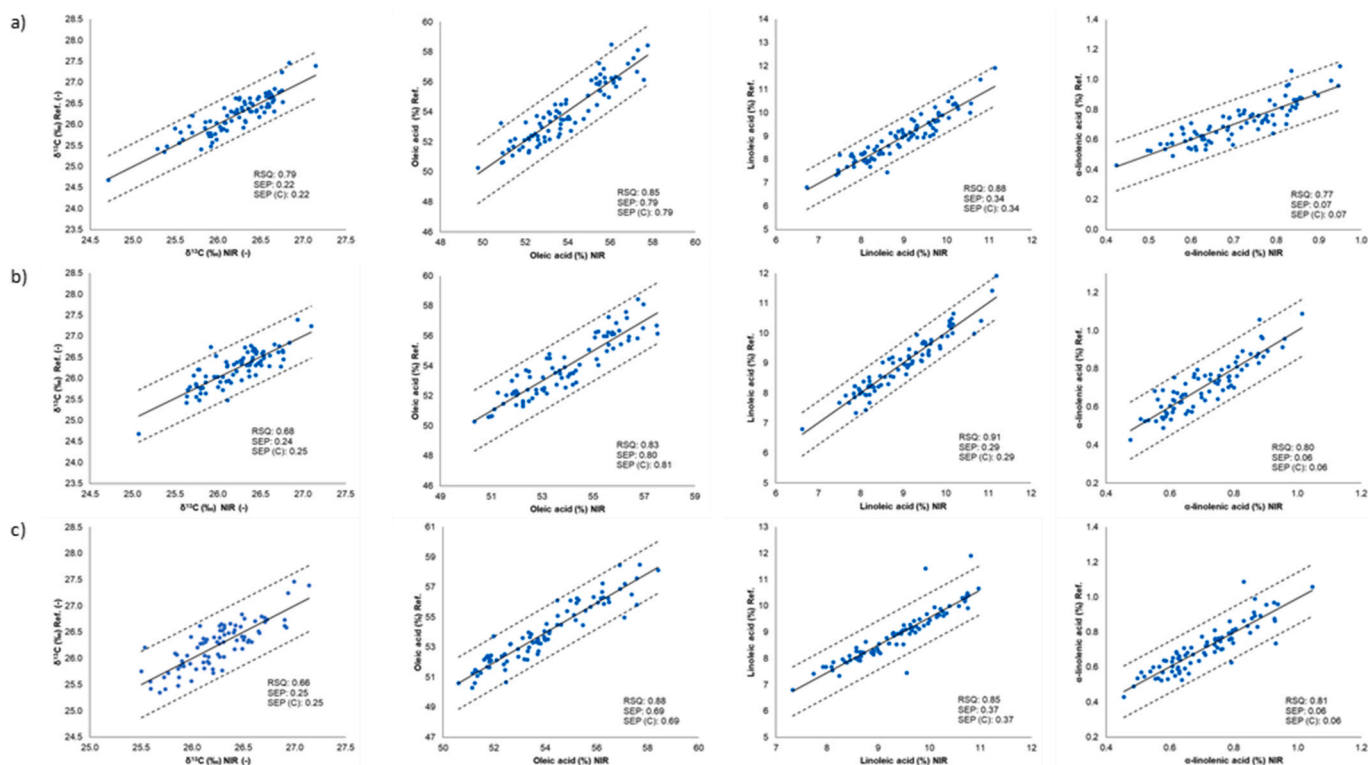


Fig. 2. Internal validation. Comparative study of $\delta^{13}\text{C}$ and Oleic acid a) Foss NIR System 5000 with a fibre-optic probe. Samples intact subcutaneous fat b) MicroNIR Pro v2.5. Samples intact subcutaneous fat and c) Foss NIR System 5000 with a “Cam-lock” probe. Samples of extracted subcutaneous fat.

Fig. 2 (continuation). Internal validation. Comparative study of linoleic and α -Linolenic acid. a) Foss NIR System 5000 with a fibre-optic probe. Samples intact subcutaneous fat b) MicroNIR Pro v2.5. Samples intact subcutaneous fat and c) Foss NIR System 5000 with a “Cam-lock” probe. Samples of extracted subcutaneous fat.

forms of register (benchtop equipment with fiber-optic probe and portable equipment) and extracted subcutaneous fat registered with the cam-lock cells with the benchtop NIR equipment. From this it can be inferred that the NIRS technique is a useful alternative that is comparable to the spectrometry of isotope masses and gas chromatography for the determination of the content of the parameters here established in samples of subcutaneous fat with both benchtop and portable NIR equipment.

In external validation the solidity of the method is checked by applying NIRS technology to 20 new samples of subcutaneous fat which were not used in the calibration models. The procedure was as follows: the spectra were registered in triplicate and the spectral average was taken, the equations obtained were applied, and the aforementioned values were compared with the reference in accordance with the residuals and the Root Mean Square Error (RMSE). Table 4 shows the results obtained in the external validation (20 samples), with the Root Mean Standard Error (RMSE) and RMSEP values, for the three forms of measurement. Moreover, with the analysis of the Student t-test for matched values, the values of $\delta^{13}\text{C}$ (‰) and fatty acids obtained with the mass spectrometer and chromatography were compared with those mentioned above in external validation with the NIRS model (with both the benchtop and portable NIR equipment). These values were higher than the minimum significance level of 0.05. The null hypothesis is therefore accepted and it can be said that there is no difference between the values of $\delta^{13}\text{C}$ (‰) and fatty acids generated by the different methods.

3.4. Comparison of results for benchtop and portable NIR equipment

When the same samples of subcutaneous fat are used in the register of both portable and benchtop NIR equipment, the potential of the portable equipment MicroNIR Pro v2.5 is assessed. When the calibration models are developed as has been mentioned, by using the portable equipment it is possible to determine $\delta^{13}\text{C}$ (‰) and 12 fatty acids in addition to the 5 summations according to their functional group (Σ saturated, Σ monounsaturated, Σ polyunsaturated fatty acids, $\Sigma\omega 3$, and $\Sigma\omega 6$). When the benchtop equipment is used one can determine, both with intact subcutaneous fat samples and extracted fat samples, $\delta^{13}\text{C}$ (‰) and 16 acids and the 5 summations of interest (Σ saturated, Σ monounsaturated, Σ polyunsaturated fatty acids, $\Sigma\omega 3$, and $\Sigma\omega 6$). It can be pointed out that the C17:0 and C20:1 acids can only be determined for the extracted fat in the benchtop NIR equipment, whereas the C20:1 acid can be determined with the portable equipment although the quantification margins are narrower. The mean values and the margins (minimum estimate-maximum estimate) within which it is possible to quantify the various constituents in the different forms of register used are similar and analogous to the chemical data of spectrometry of isotope masses for the values of $\delta^{13}\text{C}$ (‰) and the fatty acids obtained by gas chromatography. The RSQ values are always higher when benchtop NIR equipment and extracted fat is used compared with those obtained with the register of remote reflectance fiber-optic probe, which had been found in previous studies [7]. When portable NIR equipment is used the RSQ values for the constituents when compared with the same type of sample, intact subcutaneous fat, are slightly lower except in the case of C18:0 and C18:3 n6, which are slightly higher. The RPD and prediction errors are along the same lines.

4. Conclusion

Based on the results obtained in this study we confirm the suitability of the portable NIR equipment, MicroNIR Pro v2.5, for the determination in intact subcutaneous fat of Iberian pigs at the time of slaughter of $\delta^{13}\text{C}$ (‰) and of some fatty acids such as palmitic, C16:0; stearic C18:0; oleic C18:1; and linoleic C18:2, α -linolenic and γ -linolenic acids but also other fatty acids such as eicosenoic acid C20:1, heneicosanoic acid C20:0, docosadienoic acid C22:2 n6, DPA C22:5 n3 together with Σ of

Table 4

The external validation (20 samples), with the Root Mean Standard Error (RMSE) values and RMSEP

Samples of Intact Subcutaneous Fat (ISF); Extracted subcutaneous fat (ESF) and Portable NIR.

Constituent	RMSE			RMSEP		
	ESF	ISF	Portable NIR	ESF	ISF	Portable NIR
$\delta^{13}\text{C}$	0.03	0.01	0.02	0.38	0.27	0.32
C16:0	0.56	0.23	0.68	0.95	0.46	0.80
C16:1	0.01	0.01	0.02	0.21	0.24	0.27
C17:0	0.00	*		0.05	*	
C17:1	0.00	0.00	0.00	0.04	0.04	0.04
C18:0	0.47	0.29	0.50	0.82	0.65	0.88
C18:1	2.93	0.91	1.25	1.84	0.86	1.02
C18:1 n7	0.03	0.02		0.45	0.29	
C18:2	0.40	0.10	0.17	0.82	0.41	0.47
C18:3 n6	0.00	0.00	0.00	0.06	0.05	0.04
C18:3 n3	0.00	0.00	0.00	0.10	0.08	0.09
C20:1	0.01	*	0.00	0.26	*	0.05
C20:5 n3	0.00	0.00		0.03	0.03	
C21:0	0.00	0.00	0.00	0.03	0.02	0.03
C22:1	0.00	*		0.08	*	
C22:2 n6	0.00	0.00	0.00	0.08	0.05	0.08
C22:5 n3	0.00	0.00	0.00	0.04	0.03	0.03
SFA	4.28	0.83	4.03	1.76	0.74	1.48
MUFA	3.37	0.06	2.23	1.76	1.13	1.57
PUFA	0.52	0.05	0.20	0.93	0.44	0.53
w3	0.00	0.00	0.00	0.11	0.11	0.13
w6	0.36	0.10	0.15	0.77	0.45	0.44

saturated, Σ of monounsaturated and Σ of polyunsaturated fatty acids both $\Sigma\omega 3$ and $\Sigma\omega 6$. The measurement of $\delta^{13}\text{C}$ (‰) is related to the time of the *montanera* (acorns and grass) received by the Iberian pig as well as the levels of the fatty acids. The results are comparable to those obtained for the same intact subcutaneous fat sample with benchtop NIR equipment, Foss NIR System 5000, with remote reflectance fiber-optic probe. It should be noted that prediction capacity for $\delta^{13}\text{C}$ and fatty acids for both intact subcutaneous fat and extracted subcutaneous fat was always higher when these parameters were determined with the benchtop NIR equipment. This indicates that portable equipment may be an alternative to benchtop equipment, which is fixed, large, and more expensive, for the quantitative control of the parameters of interest of the Iberian pig.

Credit author statement

María Inmaculada González-Martín, Methodology, Writing - original draft. Olga Escuredo, Software, Validation. Miriam Hernández-Jiménez, Formal analysis, Software. Isabel Revilla, Conceptualization, Project administration, writing-review. Ana M. Vivar-Quintana, Conceptualization, Writing- Reviewing and Editing. Iván Martínez-Martín, Visualization. Pedro Hernández-Ramos, Formal analysis

Funding

This research was funded by Salamanca County Council (Spain), grant number 18VEUH 463AC06.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

References

- [1] R. Cava, J. Ruiz, C. López-Bote, L. Martín, C. García, J. Ventanas, T. Antequera, Influence of finishing diet on fatty acid profiles of intramuscular lipids,

- triglycerides and phospholipids in muscles of the Iberian pig, *Meat Sci.* 45 (1997) 263–270, [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(96\)00102-7](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(96)00102-7).
- [2] V. Fuentes, S. Ventanas, J. Ventanas, M. Estévez, The genetic background affects composition, oxidative stability and quality traits of Iberian dry-cured hams: purebred Iberian versus reciprocal Iberian×Duroc crossbred pigs, *Meat Sci.* 96 (2014) 737–743, <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.10.010>.
- [3] J. Ruiz, R. Cava, T. Antequera, L. Martín, J. Ventanas, C.J. López-Bote, Prediction of the feeding background of Iberian pigs using the fatty acid profile of subcutaneous, muscle and hepatic fat, *Meat Sci.* 49 (1998) 155–163, [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(97\)00136-8](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(97)00136-8).
- [4] A. Daza, J. Ruiz-Carrascal, A. Olivares, D. Menoyo, C.J. Lopez-Bote, Fatty acids profile of the subcutaneous Backfat Layers from iberian pigs raised under free-range conditions, *Food Sci. Technol. Int.* 13 (2007) 135–140, <https://doi.org/10.1177/10822013207077925>.
- [5] A.I. Carrapiso, F. Bonilla, C. García, Effect of crossbreeding and rearing system on sensory characteristics of Iberian ham, *Meat Sci.* 65 (2003) 623–629, [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(02\)00256-5](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(02)00256-5).
- [6] V.M. Fernández-Cabanás, O. Polvillo, R. Rodríguez-Acuña, B. Botella, A. Horcada, Rapid determination of the fatty acid profile in pork dry-cured sausages by NIR spectroscopy, *Food Chem.* 124 (2011) 373–378, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.06.031>.
- [7] I. González-Martín, C. González-Pérez, J. Hernández-Méndez, N. Álvarez-García, Determination of fatty acids in the subcutaneous fat of Iberian breed swine by near infrared spectroscopy (NIRS) with a fibre-optic probe, *Meat Sci.* 65 (2003) 713–719, [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(02\)00273-5](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(02)00273-5).
- [8] I. González-Martín, C. González-Pérez, J. Hernández-Méndez, N. Álvarez-García, S. Merino Lázaro, Determination of fatty acids in the subcutaneous fat of iberian breed swine by near infrared spectroscopy. A comparative study of the methods for obtaining total lipids: solvents and melting with microwaves., *J. Near Infrared Spectrosc.* 10 (2002) 257–268, <https://doi.org/10.1255/jnirs.342>.
- [9] B. Bahar, A.P. Moloney, F.J. Monahan, S.M. Harrison, A. Zazzo, C.M. Scrimgeour, I. S. Begley, O. Schmidt, Turnover of carbon, nitrogen, and sulfur in bovine longissimus dorsi and psoas major muscles: implications for isotopic authentication of meat, *J. Anim. Sci.* 87 (2009) 905–913, <https://doi.org/10.2527/jas.2008-1360>.
- [10] F. Camin, L. Bontempo, M. Perini, E. Piasentier, Stable isotope ratio analysis for assessing the authenticity of food of animal origin, *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 15 (2016) 868–877, <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12219>.
- [11] Y. Zhao, B. Zhang, G. Chen, A. Chen, S. Yang, Z. Ye, Recent developments in application of stable isotope analysis on agro-product authenticity and traceability, *Food Chem.* 145 (2014) 300–305, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.08.062>.
- [12] M.I. González-Martín, C. González, J. Hernández Méndez, C. Recio Hernández, E. Sabio Rey, Método para la caracterización y diferenciación del cerdo ibérico en función de la dieta. Boletín oficial de la propiedad industrial. G01N 30/72/2644, 1997.
- [13] I. González-Martín, C. González-Pérez, J. Hernández Méndez, E. Marqués-Macias, F. Sanz Poveda, Use of isotope analysis to characterize meat from Iberian-breed swine, *Meat Sci.* 52 (1999) 437–441, [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(99\)00027-3](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(99)00027-3).
- [14] I. González-Martín, C. González Pérez, J. Hernández Méndez, C. Sánchez González, Differentiation of dietary regime of Iberian swine by means of isotopic analysis of carbon and sulphur in hepatic tissue, *Meat Sci.* 58 (2001) 25–30, [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(00\)00126-1](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(00)00126-1).
- [15] M. Perini, F. Camin, J. Sánchez del Pulgar, E. Piasentier, Effect of origin, breeding and processing conditions on the isotope ratios of bioelements in dry-cured ham, *Food Chem.* 136 (2013) 1543–1550, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.06.084>.
- [16] E.N. Epova, S. Bérail, T. Zuliani, J. Malherbe, L. Sarthou, M. Valiente, O.F. X. Donard, ⁸⁷Sr/⁸⁶Sr isotope ratio and multielemental signatures as indicators of origin of European cured hams: the role of salt, *Food Chem.* 246 (2018) 313–322, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.143>.
- [17] I. González-Martín, C. González-Pérez, N. Álvarez-García, J.M. González-Cabrera, On-line determination of fatty acid composition in intramuscular fat of Iberian pork loin by NIRs with a remote reflectance fibre optic probe, *Meat Sci.* 69 (2005) 243–248, <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2004.07.003>.
- [18] V.M. Fernández-Cabanás, A. Garrido-Varo, J. García Olmo, E.D. Pedro, P. Dardenne, Optimisation of the spectral pre-treatments used for Iberian pig fat NIR calibrations, *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* 87 (2007) 104–112, <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2006.10.005>.
- [19] C. Hervás, A. Garrido, B. Lucena, N. García, E. De Pedro, Near infrared spectroscopy for classification of iberian pig carcasses using an artificial neural network, *J. Near Infrared Spectrosc.* 2 (1994) 177–184, <https://doi.org/10.1255/jnirs.44>.
- [20] E. Zamora-Rojas, D. Pérez-Marín, E. De Pedro-Sanz, J.E. Guerrero-Ginel, A. Garrido-Varo, In-situ Iberian pig carcass classification using a micro-electro-mechanical system (MEMS)-based near infrared (NIR) spectrometer, *Meat Sci.* 90 (2012) 636–642, <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2011.10.006>.
- [21] L. Arce, A. Domínguez-Vidal, V. Rodríguez-Estévez, S. López-Vidal, M.J. Ayora-Cañada, M. Valcárcel, Feasibility study on the use of infrared spectroscopy for the direct authentication of Iberian pig fattening diet, *Anal. Chim. Acta* 636 (2009) 183–189, <https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.01.058>.
- [22] M.C. Ortiz, L. Sarabia, R. García-Rey, M.D. Luque de Castro, Sensitivity and specificity of PLS-class modelling for five sensory characteristics of dry-cured ham using visible and near infrared spectroscopy, *Anal. Chim. Acta* 558 (2006) 125–131, <https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.11.038>.
- [23] R.M. García-Rey, J. García-Olmo, E. De Pedro, R. Quiles-Zafra, M.D. Luque de Castro, Prediction of texture and colour of dry-cured ham by visible and near infrared spectroscopy using a fiber optic probe, *Meat Sci.* 70 (2005) 357–363, <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2005.02.001>.
- [24] C. Dos Santos, M. Lopo, R. Páscoa, J. Lopes, A review on the applications of portable near-infrared spectrometers in the agro-food industry, *Appl. Spectrosc.* 67 (2013) 1215–1233.
- [25] V. Wiedemair, D. Langore, R. Garsleitner, K. Dillinger, C. Huck, Investigations into the performance of a novel pocket-sized near-infrared spectrometer for cheese analysis, *Molecules* 24 (2019) 428, <https://doi.org/10.3390/molecules24030428>.
- [26] B. de la Roza-Delgado, A. Garrido-Varo, A. Soldado, A. González Arrojo, M. Cuevas Valdés, F. Maroto, D. Pérez-Marín, Matching portable NIRS instruments for in situ monitoring indicators of milk composition, *Food Contr.* 76 (2017) 74–81, <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.01.004>.
- [27] A. Shariffar, K. Singh, E. Jones, F.I. Ginting, B. Minasny, Evaluating a low-cost portable NIR spectrometer for the prediction of soil organic and total carbon using different calibration models, *Soil Use Manag.* 35 (2019) 607–616, <https://doi.org/10.1111/sum.12537>.
- [28] R.A. Cromcombe, *Portable spectroscopy*, *Appl. Spectrosc.* 72 (2018) 1701–1751. AS.
- [29] H.I. Kademi, B.H. Ulusoy, C. Hecker, Applications of miniaturized and portable near infrared spectroscopy (NIRS) for inspection and control of meat and meat products, *Food Rev. Int.* 35 (2019) 201–220, <https://doi.org/10.1080/87559129.2018.1514624>.
- [30] S. Savoia, A. Albera, A. Brugiapaglia, L. Di Stasio, A. Ferragina, A. Cecchinato, G. Bittante, Prediction of meat quality traits in the abattoir using portable and hand-held near-infrared spectrometers, *Meat Sci.* 161 (2020) 108–117, <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2019.108017>.
- [31] D. Pérez-Marín, E. De Pedro Sanz, J.E. Guerrero-Ginel, A. Garrido-Varo, A feasibility study on the use of near-infrared spectroscopy for prediction of the fatty acid profile in live Iberian pigs and carcasses, *Meat Sci.* 83 (2009) 627–633, <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2009.07.012>.
- [32] A. Horcada, M. Valera, M. Juárez, V.M. Fernández-Cabanás, Authentication of Iberian pork official quality categories using a portable near infrared spectroscopy (NIRS) instrument, *Food Chem.* 318 (2020) 126–133, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126471>.
- [33] E. Zamora-Rojas, A. Garrido-Varo, E. De Pedro-Sanz, J.E. Guerrero-Ginel, D. Pérez-Marín, Prediction of fatty acids content in pig adipose tissue by near infrared spectroscopy: at-line versus in-situ analysis, *Meat Sci.* 95 (2013) 503–511, <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.05.020>.
- [34] D. Pérez-Marín, A. Garrido-Varo, NIR sensors for the in-situ assessment of iberian ham. Reference Module in Food Science, Elsevier, 2020, <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.22860-6>.
- [35] M.A. Luruena-Martínez, C. Palacios, A.M. Vivar-Quintana, I. Revilla, Effect of the addition of calcium soap to ewes' diet on fatty acid composition of Ewe milk and subcutaneous fat of suckling lambs reared on Ewe milk, *Meat Sci.* 84 (2010) 677–683, <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2009.11.002>.
- [36] B. Lavine, A user-friendly guide to multivariate calibration and classification, *tomas naes, tomas isakson, tom fearn and tony davies, NIR publications, chichester, 2002, ISBN 0-9528666-2-5, £45.00, J. Chemometr.* 17 (2003) 571–572, <https://doi.org/10.1002/cem.815>.
- [37] S. De Jong, *Multivariate calibration*, H. Martens and T. Naes, Wiley, New York, 1989, ISBN 0 471 90979 3. Price: £75.00, US\$138.00. No. of pages: 504, *J. Chemometr.* 4 (1990), <https://doi.org/10.1002/cem.1180040607>, 441–441.
- [38] M.S. Dhanoa, S.J. Lister, R.J. Barnes, On the scales associated with near-infrared reflectance difference spectra, *Appl. Spectrosc.* 49 (1995) 765–772, <https://doi.org/10.1366/0003702953964615>.
- [39] J. Shenk, M. Westerhaus, *Routine Operation, Calibration Development and Network System Management Manual for Near Infrared Instruments, Version 3.1*, Infrasoft International, 1995.
- [40] P.C. Williams, D. Sobering, How do we do it: a brief summary of the methods we use in developing near infrared calibrations. In: Davies, A.M.C., Williams, P.C. (Eds.), *Near Infrared Spectroscopy: the Future Waves*. NIR Publications, Chichester, West Sussex, UK, pp. 185–188.
- [41] S. Ventanas, J. Ventanas, A. Jurado, M. Estévez, Quality traits in muscle biceps femoris and back-fat from purebred Iberian and reciprocal Iberian×Duroc crossbred pigs, *Meat Sci.* 73 (2006) 651–659, <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2006.03.009>.
- [42] P. Williams, K. Norris, in: P. Williams, K. Norris (Eds.), *Near-infrared Technology in the Agricultural and Food Industries*, American Association of Cereal Chemists, St. Paul, MN, 1987.
- [43] M. Pérez-Juan, N.K. Afseth, J. González, I. Díaz, M. Gispert, M. Font i Furnols, M. A. Oliver, C.E. Realini, Prediction of fatty acid composition using a NIRS fibre optics probe at two different locations of ham subcutaneous fat, *Food Res. Int.* 43 (2010) 1416–1422, <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.04.006>.
- [44] B.G. Osborne, T. Fearn, P.H. Hindle, *Practical NIR Spectroscopy with Applications in Food and Beverage Analysis*, Longman Scientific and Technical, Essex, UK, 1993.
- [45] A. Garrido-Varo, R. Carrete, V. Fernández-Cabanás, Use of difference near infrared reflectance spectra to extract relevant information from the spectra of agro-food products, *J. Near Infrared Spectrosc.* 6 (1998) 89–95, <https://doi.org/10.1255/jnirs.125>.

- [46] T. Westad, A. Schmidt, M. Kermist, Incorporating chemical band assignment in near infrared spectroscopy regression models, *J. Near Infrared Spectrosc.* 16 (2008) 265–273.
- [47] T. Sato, Estimation of fatty acid composition in soybean powder by examining near infrared spectroscopic patterns. *Biochemistry, Chemistry and Physiology* 28 (2011) 507–520.
- [48] H.W. Siesler, Y. Ozaki, S. Kawata, H.M. Heise, in: *Near-Infrared Spectroscopy: Principles, Instruments, Applications*, Wiley-VCH, 2002.

FE DE ERRATAS / ERRGATING NOTE

Se adjunta una fe de erratas debido a que se ha detectado en la versión original publicada párrafos introducidos en español. Se ha contactado con la revista para la modificación, pero está en proceso de cambio. Por ello se adjunta el texto traducido en inglés.

An erratum is attached due to the fact that paragraphs introduced in Spanish have been detected in the original published version. The journal has been contacted for the modification, but it is in the process of being changed. Therefore, the text translated into English.

- **Point 2.4, second paragraph:**

The NIR records were obtained in two minutes. During the recording an attempt was made to minimise sampling errors. As the Iberian pig reflects in its subcutaneous fat the feed it has been given over time (the composition in fatty acids and $\delta^{13}\text{C}$), the accumulations of fat closest to the skin correspond to its last feed. Three NIR recordings are made and in each recording 32 different points are taken from an area of 5 cm x 5 cm which gives rise to an average spectrum. The process is repeated 3 times and the mean spectrum is accepted if there are no differences greater than H (Mahalanobis distance).

- **Point 3.2, second, third and fourth paragraph:**

Slight differences occur in our work depending on the recording method and the equipment, which generally derive from C-H combinations with other vibrational modes [46]. The band observed at 1724 nm is therefore related to the C - O bond in lipids. At that wavelength, in the case of oleic acid in extracted fat the value of β is very high, 6519.9, which would justify the improved calibration of this parameter in extracted fat compared to that obtained from intact samples. Similar results have been obtained by other authors [33,47], who observe that the 1720-1730 band increases when the instauration in fatty acids increases and in addition a shift to longer wavelengths when the chain length of the fatty acids increases. At 2380 nm, a correlation with linolenic acid is observed with a β value of 472.4 in extracted fat samples. This area of the NIR spectrum corresponds to the C-H combination bands of the fatty acids [42,44], which justifies the calibration in this type of sample.

In relation to the calibration models obtained for $\delta^{13}\text{C}$, we found for the area of the spectrum recorded only with the portable equipment (from 908 nm to 1100 nm) that at 1000 nm there are β values of 168 corresponding to the second overtone of NH_2 , -NH of secondary amines, and at 1069 nm β values of 153.5 corresponding to $-\text{CONH}_2$ primary amides [48]. Both could be related to the feeding of pigs on the pasture (acorns, grass). When looking for $\delta^{13}\text{C}$ correlations with the optical fiber probe, again strong correlations are found at 1356 nm and β values of 2218, which are related to a combination of $-\text{CH}_3$ methyl groups at 1532 nm with β of 1161 (corresponding to N-H stretch bonds and the first overtone of R- NH_2 bonds [44]) and at 1820 nm with β values of 1281. All these correlations justify the determination of the $\delta^{13}\text{C}$ parameter in subcutaneous fat samples.

It is also interesting to note that in the area of the spectrum obtained with the portable equipment between 1010-1100, β coefficients for the Σ monounsaturated, Σ saturated, and Σ

polyunsaturated fatty acids of 574, 537 and 143 are obtained, which correspond to the -CH₃ combination and -CH₂ combination groups [48].

Artículo 2 / Article 2.

Título / Title: Carbon stable isotopes, fatty acids and the use of NIRS to differentiate Iberian pigs. (*Isótopos estables de carbono, ácidos grasos y el uso de NIRS para diferenciar a los cerdos ibéricos.*)

Autores / Authors: Miriam Hernández-Jiménez, María Inmaculada González-Martín, Iván Martínez-Martín, Isabel Revilla, Ana María Vivar-Quintana

Revista / Journal: *Meat Science* 2021, 182, 108619.

- (Elsevier) (Enviado: 17 de julio de 2020. Aceptado: 30 de junio de 2021. Publicado: 7 de julio de 2021).
- (Elsevier) (Submitted: 17 de July de 2020. Accepted: 30 June 2020. Publication date: 7 July 2021).

<https://doi.org/10.1016/J.MEATSCI.2021.108619>

Índices de calidad / Quality indices:

Cuartil / Quartile: Q1

Área / Area: Food Science and Technology

Posición de la revista / Position of the journal: 16/144

Factor de impacto / Impact factor: 7.077 (2021)

Número de citas / Number of citations: 2 Google Scholar / 2 Web of Science (21 March 2023)

Resumen

La norma de calidad relativa al cerdo ibérico incluye diferentes categorías en función de si la raza es 100% o 50% (cruce de ibérico con Duroc) y del tipo de alimentación (cebo, cebo de campo o bellota) ya que estos factores influyen en la calidad del producto. La forma tradicional de crianza del cerdo ibérico es la montanera. Estudios previos han puesto de manifiesto que cuanto mayor es el tiempo que el cerdo ibérico se alimenta en montanera se produce un aumento del contenido en ácido oleico, α -linolénico y el sumatorio de AGP de la grasa, al tiempo que produce una disminución del contenido de ácido linoleico, el total de ácidos grasos n-6 y la relación n-6/n-3. Por ello, la composición de los ácidos grasos de la grasa subcutánea se ha utilizado tradicionalmente como una herramienta adecuada para la clasificación de los animales según su alimentación. Otro análisis que permite aportar información sobre la dieta es el valor de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) en la grasa del animal, debido a que la dieta basada en plantas C4 (ciclo Hatch-Slack) tales como el maíz o C3 (Calvin-Benson) como la bellota o el pasto influyen sobre el valor de $\delta^{13}\text{C}$ (‰).

Las normativas actuales no contemplan métodos analíticos de control. Es por ello por lo que se demandan nuevas tecnologías que permitan de forma rápida y económica obtener resultados. La espectroscopía de infrarrojo cercano (NIR) es una alternativa ya empleada para evaluar características de la carne y ha sido usada en el cerdo ibérico para la cuantificación de proteína, grasa, humedad, perfiles de ácidos grasos y determinar la dieta durante el proceso de engorde.

El objetivo del presente trabajo fue estudiar el perfil de ácidos grasos y la relación isotópica de carbono según el número de días que los cerdos ibéricos permanecieron en montanera. Por otro lado, el estudio también compara diferentes metodologías para poder diferenciar muestras según la duración de la montanera tales como el uso de datos espectrales NIR, la composición de ácidos grasos o la combinación de estos últimos con la relación isotópica.

Se muestrearon tres granjas, dos con animales 100% ibéricos y una con animales 50% ibéricos, antes de la entrada en montanera (8 biopsias por granja) y después de diferentes periodos de montanera: Granja 1, 68 días (30 muestras); Granja 2, 84 días (31 muestras) y Granja 3, 120 días (45 muestras). Todas las muestras de grasa subcutánea se tomaron de manera individualizada en la zona del cóccix, en forma de biopsias para el muestreo pre-montanera. Las muestras tomadas en el momento del sacrificio se tomaron haciendo un corte a pocos centímetros de la cola siguiendo la línea de la columna vertebral. La cuantificación de un total de 33 ácidos grasos se realizó tras la extracción y metilación mediante un cromatógrafo de gases acoplado a un ionizador de llama. Para el análisis de isótopos estables de carbono se utilizó el espectrómetro de masas tras la digestión y dilución de la muestra. Los registros NIR se tomaron usando el equipo Foss NIR System 5000 en la grasa subcutánea extraída por microondas en modo reflectancia entre las longitudes de onda de 1100 a 2498 nm, usando una sonda cam-lock con un paso óptico de 0,1 nm. La existencia de diferencias significativas debidas a los factores considerados (montanera, tiempo de montanera y pureza racial) para los parámetros analizados se determinó mediante un análisis GLM (modelo general lineal). El estudio de la existencia de correlaciones significativas entre el valor de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) y los diferentes ácidos grasos se llevó a cabo mediante la r de Pearson. Para el análisis discriminante de las muestras se utilizaron los modelos RMS X

Residual y OPLS-DA. La predicción de los valores de ácidos grasos y $\delta^{13}\text{C}$ (‰) a partir de los espectros NIRS se realizó usando el método de regresión de mínimos cuadrados parciales modificados (MPLS) utilizando el 80% de las muestras en un grupo de calibración y el 20% restante en un grupo de validación.

El análisis de los valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) permitió observar que los valores más negativos en las muestras *pre-montanera* correspondían a las granjas de raza 100% ibérica encontrándose diferencias significativas entre granjas ($P < 0,001$). Para la grasa subcutánea *post-montanera* se observó un aumento significativo del valor absoluto de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) en todos los casos, siendo especialmente importante en la Granja 3 de raza 50% ibérico. Estos resultados confirman que el valor absoluto de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) aumentó con el consumo de bellotas. Otra observación relevante fue que la Granja 2 (raza 100% ibérica) mantuvo el mayor valor absoluto de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) a pesar de su menor variación debido a que el periodo de estancia en montanera fue más corto que en la Granja 3. La composición de ácidos grasos antes y después de la montanera mostró un aumento significativo de los AGI y una reducción de los AGS. Se observó que los mayores cambios en el perfil lipídico fueron experimentados por la Granja 3 (50% ibérica), la de mayor período en montanera. El estudio de las correlaciones entre ambos tipos de analitos permitió observar correlaciones positivas (cuanto menor valor absoluto de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) mayor es la concentración de ácidos grasos) para los AGS y el ácido γ -linolénico antes y después de la montanera, encontrándose valores de correlación de Pearson ligeramente inferiores después de la montanera. En los ácidos grasos oleico, α -linoleico y ácido docosadienoico se observaron correlaciones negativas antes y después de montanera lo que podría indicar una alimentación *pre-montanera* a base de pienso rico en ácido oleico y ácido α -linolenico. El comportamiento que tuvieron los ácidos grasos pentadecanoico, heptadecanoico y heptadecenoico con correlaciones negativas en *pre-montanera* y minimizando la correlación en *post-montanera* puede indicar que son característicos de una alimentación a base de piensos. Después de la montanera se pudieron observar correlaciones negativas notables entre $\delta^{13}\text{C}$ (‰) y la suma de AGP y la suma de AGP n-3, lo que indicaría que valores más negativos de $\delta^{13}\text{C}$ (‰), obtenidos en la grasa de animales con mayor número de días en montanera, se correlaciona con estos ácidos grasos que son, a su vez, responsables de la calidad de los productos ibéricos.

En cuanto a los análisis discriminantes se tomaron diferentes conjuntos de datos y se emplearon diferentes modelos que se ajustarán al tipo de dato. En primer lugar, se utilizó la información espectral NIR en el rango de 1100-2000 nm y se analizó mediante el método RMS X Residuals. Los resultados de clasificación, tanto usando los datos espectrales de la grasa de biopsias como los datos espectrales de la grasa *post-montanera*, mostraron que fue posible clasificar correctamente el 100% de las muestras en función de la granja de procedencia. Un segundo método discriminante utilizó los valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) y del perfil lipídico sobre los que se aplicó el modelo OPLS-DA, tanto para el conjunto de 106 muestras de grasa subcutánea como para el conjunto de 130 muestras de biopsias y grasa subcutánea. En ambos casos con dicha información se obtuvieron porcentajes de clasificación correcta del 100% de las muestras en función de las diferentes granjas. También se obtuvieron resultados del 100% de clasificación correcta en el caso de aplicar el modelo únicamente con los valores de ácidos grasos. Sin embargo, este modelo presentó valores de estimación del potencial predictivo más bajos

revelando la importancia que tiene la contribución de la relación isotópica para la diferenciación de muestras en función del periodo en montanera.

La predicción de los valores de ácidos grasos y del valor de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) en muestras de grasa subcutánea pre y post-montanera, de manera conjunta, se llevó a cabo mediante la información espectral en la región NIR comprendida entre 1.100-2.500 nm y usando el método MPLS. Con esta metodología se han podido calibrar 14 ácidos grasos, los sumatorios de los principales grupos de ácidos grasos y el valor de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) con valores de $\text{RSQ} > 0.75$ (excepto para C17:1).



Carbon stable isotopes, fatty acids and the use of NIRS to differentiate IBERIAN pigs

Miriam Hernández-Jiménez^a, María Inmaculada González-Martín^{b,*}, Iván Martínez-Martín^a, Isabel Revilla^a, Ana María Vivar-Quintana^a

^a Food Technology, University of Salamanca, Polytechnic High School of Zamora, Avenida Requejo 33, 49022 Zamora, Spain

^b Analytical Chemistry, Nutrition, and Bromatology, University of Salamanca, Plaza de la Merced s/n, 37007 Salamanca, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Iberian pig
NIRS
Fatty acids
 $\delta^{13}\text{C}$,
Stable isotopes
Discrimination.

ABSTRACT

This study explores the viability of the application of Near Infrared Spectrometry (NIR) for the rapid prediction of the ratio of $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ stable isotopes and fatty acid composition in Iberian pigs. The potential use of this technique for distinguishing samples according to the duration of the *montanera* period was also studied. Subcutaneous fat samples from 50% and 100% Iberian pigs allowed to feed freely during different *montanera* periods were analyzed: 24 biopsies were taken prior to the *montanera* and 106 samples were taken after this feeding period. The results show significant correlations between $\delta^{13}\text{C}$ (‰) and several fatty acids. Furthermore, it is possible to differentiate samples taken from pigs reared using different feeding regimes by analyzing the data obtained from the NIR spectra or by applying an Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis (OPLS-DA) on data on $\delta^{13}\text{C}$ (‰) and fatty acids in subcutaneous fat.

1. Introduction

The Iberian pig is of great importance to the Spanish economy, and has traditionally been consumed as sausages and, in particular, as Iberian acorn-fed ham, which is the product that is the most well-known. The quality label of 'Iberian pig' includes the pure Iberian breed and Iberian crossbreeds, with Duroc being the most commonly used breed for creating hybrids. The most important characteristic of the Iberian pig is that it produces a high amount of intramuscular fat which gives its meat a veined appearance and its distinctive juiciness and flavor. This quality is due not only to the breed, but to also to a particular rearing method known as *montanera*, where Iberian pigs during the last stage of their lives are allowed to roam freely and feed on the natural resources (mainly holm oak and cork acorns and grass) available in the *dehesa* ecosystem. The feeding conditions influence the endogenous and exogenous synthesis of fatty acids in the pigs (Cava et al., 1997; Ruiz et al., 1998), and it is known that the longer the *montanera* period, the higher the C18:1n-9, C18:3n-3 and ΣMUFA content and the lower C18:2n-6, n-6 and n-6/n-3 content present in the animals (Daza, Ruiz-Carrasco, Olivares, Menoyo, & López-Bote, 2007; Rey, Daza, López-Carrasco, & López-Bote, 2006). It is for this reason that the fatty acid composition of Iberian pig subcutaneous fat has been used as a suitable tool for

classifying animals in accordance with the feed used to fatten them (Delgado-Chavero, Zapata-Márquez, García-Casco, & Paredes-Torronteras, 2013). However, Spanish regulations governing Iberian products do not include the use of fatty acid profiles for distinguishing commercial categories (Official State Bulletin [BOE], 2014); although current legislation establishes how the purity of the pig breeds is controlled as well as extensive production systems linked to a *dehesa* environment by means of inspections and certifications issued by the National Accreditation Entity (ENAC).

Carbon isotope ratios can also provide information about an animal's diet (De Niro & Epstein, 1978), with the C4 and C3 plant material content in feed having a great influence on the animals' $\delta^{13}\text{C}$ (‰) value (Bahar et al., 2005; Bahar et al., 2009). For this reason, studying the carbon ($\delta^{13}\text{C}$) and sulphur ($\delta^{34}\text{S}$) isotopic ratio has also been used as a method to distinguish animals according to their feeding regime (González-Martín, González-Pérez, Hernández Méndez, Marqués-Macias, & Sanz Poveda, 1999; González-Martín, González, Hernández Méndez, Recio Hernández, & Sabio Rey, 1997; González-Martín, González Pérez, Hernández-Méndez, & Sánchez González, 2001; López-Bascón et al., 2015). The analysis of fatty acids and isotopes of fatty acids has also been studied to distinguish Iberian pigs according to the type of feed that is used during the fattening process (Delgado-Chavero et al.,

* Corresponding author.

E-mail address: inmaglez@usal.es (M.I. González-Martín).

<https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2021.108619>

Received 17 July 2020; Received in revised form 28 June 2021; Accepted 30 June 2021

Available online 7 July 2021

0309-1740/© 2021 The Author(s).

Published by Elsevier Ltd.

This is an open access article under the CC BY-NC-ND license

(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

2013; Recio, Martín, & Raposo, 2013).

Nonetheless, all of these methods present drawbacks owing to the availability of commercially sold fattening concentrates, which mimic the composition of the main fatty acids (palmitic, stearic, oleic and linoleic) of acorn and grass and can distort analytical results (Delgado-Chavero et al., 2013). Moreover, differences can arise in the fatty acid profile between years due to the variability of the quality of acorns used to feed the pigs.

Several other analytes have been assessed for their utility in determining the feed consumed by pigs during the fattening period such as tocopherols (Rey et al., 2006), volatile compounds (Sánchez del Pulgar et al., 2013) and the triacylglycerol profile (Bayés-García et al., 2016; Viera Alcaide, Vicario, Escudero Gilete, Graciani Constante, & León Camacho, 2008). However, the further processing industry continues to analyze and make use of pork fatty acid profile as it greatly influences both fresh and dry cured color and fat oxidation (Gilles, 2009; Melgar, Cid, Astiasarán, & Bello, 1991; Ruiz-Carrascal, Ventanas, Cava, Andrés, & García, C., 2000; Ventanas, Andrés, Cava, Tejada, & Ruiz, 1999; Ventanas, Ventanas, Jurado, & Estévez, 2006). Moreover, determination of the fatty acid profile also helps processors decide on salting and drying times during the production of dry-cured ham (Cava López & Andrés Nieto, 2001).

In addition to the above mentioned methods, Near infrared spectroscopy (NIR) may be considered an interesting alternative as it is much faster and cheaper to use. Additionally, this tool has been widely used to assess the characteristics of meat and the quality of meat products (Prieto, Roehe, Lavín, Batten, & Andrés, 2009). In the case of Iberian pigs, this technique has been used to quantify protein, fat and moisture contents (Zamora-Rojas, Garrido-Varo, De Pedro-Sanz, Guerrero-Ginel, & Pérez-Marín, 2011), fatty acid profiles (De Pedro, Garrido, Bares, Casillas, & Murray, 1992; De Pedro, Garrido, Lobo, Dardenne, & Murray, 1995; Fernández-Cabanás, Garrido-Varo, García Olmo, Pedro, & Dardenne, 2007; Gonzalez-Martin, Gonzalez Perez, Hernandez Mendez, & Alvarez-Garcia, 2003) as well as to determine the pig's diet during the process of fattening (Arce et al., 2009; Hervás, Garrido, Lucena, García, & De Pedro, 1994; Zamora-Rojas et al., 2011; Zamora-Rojas, Pérez-Marín, De Pedro-Sanz, Guerrero-Ginel, & Garrido-Varo, 2012).

Taking all of the above into consideration, the first aim of this work was to study the fatty acid profile and the progression of the carbon isotopic ratio according to the production system used for pig rearing and the days during which the *montanera* took place. For this purpose, tissue samples were taken by means of biopsies prior to the onset of the *montanera* and then later on in the slaughterhouse after the animals had experienced different *montanera* durations. This approach has previously been used by other authors to test the influence of diet on fatty acid composition (Barea, Isabel, Nieto, López-Bote, & Aguilera, 2013; Pascual et al., 2006). However, the effect of different *montanera* feeding times on the fatty acid profile and on the carbon isotopic ratio has not until now been considered. In addition, the feasibility of predicting fatty acid composition and $\delta^{13}\text{C}$ (‰) in samples taken before and after the *montanera* was also studied. Prediction of the 13C/12C stable isotope ratio has recently been performed (González-Martín et al., 2021) in subcutaneous fat but not through the use of biopsies. Moreover, to our knowledge, no study has established whether there are significant relationships between $\delta^{13}\text{C}$ (‰) and fatty acids and whether these relationships change due to a *montanera* feeding regime.

Finally, the most relevant purpose of this work was to study the feasibility of differentiating samples according to the production systems employed and the duration of the *montanera*, since the more days the animals spend feeding freely on acorns and grass, the higher the quality of the final products. This approach differs from previous work comparing animals fed on acorns and grass with animals fed exclusively on formulated feed (*cebo*) or given formulated feed just before being slaughtered (*recebo*) (Delgado-Chavero et al., 2013; Recio et al., 2013; Ruiz et al., 1998), or studies comparing the results obtained after feeding on different types of acorn vs grass (Rey et al., 2006). To this end,

different methodologies, such as using only NIR spectra, only fatty acid composition or fatty acids plus the isotopic ratio, were compared to determine the optimal method for differentiating animals according to the feeding regime employed.

2. Materials and methods

2.1. Samples

Subcutaneous fat samples were taken from Iberian pigs in three different monitored farms during the 2018–2019 season. All animals were *montanera*-fed during the last fattening stage (diet based on acorns, grass and other resources naturally found in a *dehesa* ecosystem) in the same geographic area (Badajoz, Spain). Farm 1 rears pigs that are 100% Iberian and carries out a *montanera* over a course of 68 days, farm 2 also rears pigs that are 100% Iberian but the *montanera* period is 84 days and farm 3 rears 50% Iberian-Duroc crossbreeds and the *montanera* is for 120 days. All batches were identified by means of the ITACA System and ear tags, which are assigned according to feeding batches. This requirement is mandatory and regulated within the Iberian pig Quality Standard (Order AAA/1549/2014, of 28 August) for all pig farmers. This identification number allows National Accreditation Entity ENAC to monitor and certify each batch and to ensure its traceability and that the requirements of care in production and quality regulated by the Iberian pig Quality Standard are met. The numbers of the different batches were: Farm 1 - LOTE-EXP-170425-245,768; Farm 2 - LOTE-EXP-170913-274,668; and Farm 3 - LOTE-EXP-171026-285,571.

The samples were collected at two different time points, with the first sample collection involving biopsies carried out on live animals (24 animals from each farm). The biopsies were taken the first day of *montanera* and the pigs had a live weight ranging from 92 to 115 kg. All the samples were taken on the farm by a veterinarian from the coccyx area following the method described by Bosch-Puig, Puigvert-Colomer, Tor-Naudí, Villalba-Mata, and Estany-Illa (2008). Briefly, the biopsy site was cleaned, shaved and disinfected (chlorhexidine digluconate). The biopsy was taken using the spring loaded biopsy equipment (PPB-U Biotech, Nitra, Slovakia). Once the sample was extracted, the biopsy site was again disinfected. The samples were collected from the cannula and introduced in individual plastic tubes with the animal reference number, cleaning properly the cannula before taking the next sample.

The second sampling was of subcutaneous fat taken in the coccyx area of the pig carcasses, a few centimeters from the tail following the line of the vertebral column. Just before being slaughtered, the animals had a live weight ranging from 130 to 160 kg. A total of 72 biopsied samples were collected (24 animals from each of the three farms) and 106 samples were collected from the subcutaneous fat of the carcasses (30 samples from farm 1, 31 samples from farm 2 and 45 samples from farm 3).

The samples were kept frozen until analysis ($-28\text{ }^\circ\text{C}$). Since the tissue size of the biopsies was small, 3 biopsies from different animals from the same farm were pooled for analysis. After the removal of impurities from the skin and loin, the fat samples collected after slaughter were homogenized using a Polytron blender until a uniform mixture was obtained. The mixtures were then melted in a microwave oven according to the method described by González-Martín, González-Pérez, Hernández-Méndez, Álvarez-García, and Merino Lázaro (2002).

2.2. Instrumentation and methods

2.2.1. Fatty acid analysis

To quantify the fatty acids, 0.1 g of extracted fat were weighed. The fatty acids (FA) were methylated using the method described by Murieta, Hess, and Rule (2003). Quantification was performed by gas chromatography (gas chromatograph (GC) 6890 N; Agilent Technologies, Santa Clara, CA), using a 100 m \times 0.25 mm \times 0.20 μm capillary column (SP-2560; Supelco, Bellefonte, PA). The chromatographic

conditions were as described in a previous study (González-Martín, Vicente Palacios, Revilla, Vivar-Quintana, & Miguel Hernández-Hierro, 2017). Using this method, the fatty acids ranging from C12:0 and C22:6 were determined. They were identified by comparing the retention times with the corresponding standards (Sigma Aldrich, Steinheim, Germany). The results were expressed as a percentage, according to the peak areas of the chromatogram.

2.2.2. Stable isotope analysis

The HCOS EURO EA 3000 elemental analyzer with a high temperature combustion system and a dilution system connected to a continuous gas flow isotope mass spectrometer (ISOPRIME, Micromass) was used to analyze stable carbon isotopes ($\delta^{13}\text{C}$). The natural abundance of ^{13}C was expressed as $\delta^{13}\text{C} = [(13\text{R sample} / 13\text{R standard}) - 1] 1000$, where $^{13}\text{R} = ^{13}\text{C} / ^{12}\text{C}$ according to the international PDB standard with a precision (2σ) of 0.05–0.08‰ from CO_2 measurement in a double-beam spectrometer.

2.2.3. Near infrared spectrometry spectra (NIRS) register

NIRS were determined using a Foss NIR System 5000 and the fat extracted from the biopsied tissue and from the subcutaneous fat samples. The fat was thermostatted in a bath at 30 °C and 15 μl of liquid fat were collected. Circular capsules with an optical path length of 0.1 nm (cam-lock cells) were used to introduce each sample into the analyzer. Spectra were recorded in triplicate in reflectance mode between 1100 and 2498 nm at 2 nm intervals with 32 scans. All spectra were presented as the logarithm of the reciprocal reflectance ($\log 1/R$) (R = reflectance). The Win ISI 1.50 software package was used for spectra collection, data manipulation and chemometric analysis. For the NIR calibrations, the samples were randomly divided into two groups: the calibration group comprising 80% of the samples (104 samples) and the validation group with the remaining 20% (26 samples).

2.3. Data analysis. Chemometric methods

Statistically significant differences in fatty acid content and $\delta^{13}\text{C}$ (‰) values, due to breed 100% Iberian ($n = 61$) vs. 50% Iberian ($n = 45$), the *montanera* before ($n = 24$) or after ($n = 106$) and the feeding regime farm 1 ($n = 30$), farm 2 ($n = 31$), farm 3 ($n = 45$) and their interactions, were determined by the General Linear Model (GLM) using the SPSS 25 package (IBM, Chicago, IL, USA).

2.3.1. Discriminant analysis

Two discriminant analysis models were used. First, information from the NIR spectra was used and spectral differentiation was obtained using the RMS X (the square root of the residual mean squared (RMS) was calculated to obtain the RMSX residuals). This measure is useful for detecting spectral variation that is not similar to the spectral variation in the good product data set (Nørgaard, Haunstrup, Petersen, Weimann, & Sørensen, 2014). In this case WinISI 4.0 software was used.

Secondly, SIMCA-P software version 14.1 (Umetrics) was used to carry out the chemometric analysis of $\delta^{13}\text{C}$ (‰) and fatty acid values of each fat sample extracted from the biopsied tissue and from the subcutaneous fat samples. A Principal Component Analysis (PCA) was first applied to each monitored category (farm 1, farm 2 and farm 3) to allow the identification of outliers (Alonso et al., 2008). Once outliers were identified and removed by PCA analysis, an Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis (OPLS-DA) was performed on the entire dataset (106 subcutaneous fat samples or 130 biopsied tissue and subcutaneous fat samples). The data were randomly divided into a training set (80% of the samples) to build the discriminant model and a validation set (20% of the samples selected to include a balanced number of samples from the three groups) to test the model performance. The best OPLS-DA model was chosen considering the discrimination ability given by the number of correctly classified samples and the Q2 parameter. The quality assessment statistic (Q2) is the result of the cross-validation and

provides a qualitative measure of the consistency between the predicted and original data (Worley & Powers, 2013).

2.3.2. NIR analysis

Calibration models were obtained using the NIR spectra and chemical data (^{13}C isotopes and fatty acids) for each sample. Sample spectra were processed by PCA to detect outliers. The global Mahalanobis (H) distance considered spectra with an $H \geq 3.0$ standard units from the mean spectrum as outliers (Shenk & Westerhaus, 1996). The use of this standardized H statistic entailed a nearly inexistent risk of including samples that did not belong to the population in the set from which the calibration equations would be obtained. In addition, samples that had a predicted residual value of $T \geq 2.5$ in the chemical data were considered different from the population and removed from the set (Williams & Norris, 1987). Once the samples were removed according to the H-criterion for the spectra and the T-criterion for the chemical data, the statistical parameters of the calibration were obtained. The modified partial least squares (MPLS) regression method was used for the calibration of fatty acids and $\delta^{13}\text{C}$ (‰) (Martens & Naes, 1989). The whole region of the spectrum was used; several corrections based on mathematical treatments and scatter corrections (standard normal variant, SNV; De-trending, DT; multiplicative spread corrections, MSC; first derivative and second derivative) were applied. To avoid over-fitting in the development of the MPLS equations, a cross-validation was performed to make 7 groups of samples. The selection criterion to obtain the best equations for each of the components was the highest multiple correlation coefficient (RSQ) and the lowest calibration and cross-validation standard error (SEC and SECV). The equations obtained were applied to the validation set to obtain a corrected standard error of prediction (SEPC) and a bias (the residual mean defined as the distance between the laboratory value and the value predicted by the equation) for each component. The method robustness was checked by applying the calibration equations obtained during the study to the NIR spectra of new samples that did not belong to the calibration group. The predicted values were then compared with the reference data. The method for analyzing NIRS and the reference data were compared using Student's *t*-test for paired values. The *P*-value, residual mean and root mean squared error (RMSE) values were calculated.

3. Results and discussion

3.1. Stable carbon isotopes

Terrestrial plants assimilate atmospheric CO_2 in two different ways: by means of C_3 cycle (Calvin-Benson) or by means of C_4 cycle (Hatch-Slack) which is energetically more efficient.

C_3 plant tissues are depleted in CO_2 in relation to the atmosphere to about 19%, while the C_4 plant tissues are depleted to about 4%. Indeed, plants preferentially assimilate the lighter and more abundant isotope ^{12}C . The $\delta^{13}\text{C}$ value for atmospheric CO_2 is 0‰ (although in laboratories the PDB standard is used as a reference, which refers to the Cretaceous belemnite formation at Pee Dee, South Carolina, USA). This means that the $\delta^{13}\text{C}$ ‰ values are negative when compared to that of atmospheric CO_2 . As a consequence, the different diets of humans or animals in different geographical regions are reflected in the isotopic depletion in their tissues. This phenomenon is called isotopic fractionation.

Table 1 shows the results of the $^{13}\text{C} / ^{12}\text{C}$ stable isotope ratio in fat extracted from the biopsied samples (before the *montanera*) and subcutaneous fat samples (after the *montanera*), expressed as $\delta^{13}\text{C}$ (‰). These results correspond to the three stockbreeding farms rearing pigs that were either 100% Iberian (farms 1 and 2) or 50% Iberian-Duroc cross-breeds (farm 3) and using *montanera* periods of different durations (68, 84, or 120 days). The values obtained were similar to those previously reported in the subcutaneous fat of pigs fed during *montanera* (López-Bascón et al., 2015).

The most negative $\delta^{13}\text{C}$ (‰) values obtained corresponded to the

Table 1

Average values of $\delta^{13}\text{C}$ (‰) according to the characteristics of the subcutaneous fat of biopsies (before the *montanera*) and subcutaneous fat (after the *montanera*).

		100% Iberian		50% Iberian
		Farm 1	Farm 2	Farm 3
Biopsies	Range	–25.18 to –25.59	–25.94 to –26.35	–24.59 to –25.40
	Mean	–25.37 ^{b,x}	–26.19 ^{c,x}	–25.01 ^{a,x}
	N	8	8	8
Subcutaneous fat	Range	–25.35 to –26.63	–26.09 to –26.89	–24.68 to –27.46
	Mean	–25.89 ^{a,y}	–26.50 ^{b,y}	–26.34 ^{a,b,y}
	Days in <i>montanera</i>	68	84	120
	N	30	31	45

a,b,c Different letter means statistically significant ($P < 0.05$) differences among groups.

x,y Different letter means statistically significant ($P < 0.05$) differences due to the *montanera*.

biopsied samples taken from 100% Iberian pigs, showing differences that were statistically significant ($P < 0.001$). Previous studies have found that Iberian pigs present higher absolute $\delta^{13}\text{C}$ (‰) values than white breeds, which is probably due to the higher intramuscular fat of the Iberian breed (González-Martín et al., 2001). Moreover, two interesting aspects were observed in the subcutaneous fat samples (obtained after slaughter) of the animals that underwent different *montanera* periods. First, a significant increase in the absolute $\delta^{13}\text{C}$ (‰) value was observed in 50% Iberian-Duroc crossbreeds ($P < 0.001$) as compared to that obtained using the biopsied samples (taken before *montanera*). This breed of animals were allowed to feed freely during the longest *montanera* period (120 days), with the results indicating that feeding on acorns and grass (C3 plants) significantly influenced the 13C / 12C isotopic ratio. Another relevant finding was that the animals from Farm 2 (100% Iberian) maintained the highest absolute $\delta^{13}\text{C}$ (‰) value despite its lower variation compared to the value recorded in the biopsies due to the short period spent in the *montanera*.

These results confirm that the $\delta^{13}\text{C}$ (‰) absolute value increased with acorn consumption, as previously reported (González-Martín et al., 1999), and suggest that $\delta^{13}\text{C}$ (‰) values could be used to recreate the diet fed to the animals during the *montanera* period. Thus, when the feeding regimes, as established by Spanish legislation (*Bellota* [*montanera* feeding regime], *Cebo de campo* [*montanera* feeding supplemented with fodder] and *Cebo* [fodder feeding]) were compared, the $\delta^{13}\text{C}$ (‰) was significantly modified in all cases (López-Bascón et al., 2015). However, no previous studies have been reported on the influence of the *montanera* period on this parameter. As previously mentioned, the different batches of pigs were feed in the same geographical area. On the other hand, breed has not been previously reported to affect the isotopic value $\delta^{13}\text{C}$ (‰). Therefore, the observed changes may be associated with the different time of *montanera*.

3.2. Fatty acid composition

The fatty acid compositions of the pigs reared on the three farms before and after *montanera* are shown in Table 2. It should be noted that it was possible to quantify 33 fatty acids from C12:0 to C22:6 n3 using gas chromatography. Additionally, Σ saturated, Σ monounsaturated and Σ polyunsaturated fatty acids and total w3 and w6 were calculated. The results obtained on the 3 farms showed that the *montanera*-based feeding significantly increased the amounts of oleic (C18:1), gadoleic (C20:1 n9), linoleic (C18:2 n-6) and eicosapentaenoic (C20:5 n3) acids. A reduction in saturated acids, such as palmitic acid (C16:0) and stearic acid (C18:0) among others, was also observed. Fatty acid profile modification was especially significant in farm 3 (50% Iberian), the one with

the largest *montanera* period, a change that is characteristic of the *montanera* feeding system (Daza et al., 2007; López-Bascón et al., 2015). The significant interaction observed between *montanera* and farm for most of the fatty acids can be attributed to this result. This is because acorns are high in oleic and linoleic acid (>60% and > 17% of total fatty acids respectively) while the main fatty acid found in grass is linolenic acid (> 55%) (Tejerina, García-Torres, Cabeza de Vaca, Vázquez, & Cava, 2011), which is the precursor of the other w3 fatty acids. Furthermore, fatty acid composition of fat in monoviviparous animals depends on the fat composition of the diet (Monahan, Buckley, Morrissey, Lynch, & Gray, 1992).

Regarding the effect of the breed of the animals, the biopsies from 100% Iberian pigs showed significantly higher levels of C18:1, C18:1n-7 and C18:2 n6, C18:3 n6 ($P < 0.001$). Previous studies have shown that, under similar feeding regimes, purebred Iberian pigs tend to accumulate higher levels of monounsaturated fatty acids, particularly oleic acid, than 50% Iberian x Duroc crosses (Niñoles, Clemente, Ventanas, & Benedito, 2007), as well as higher PUFA contents (Antequera et al., 1994). However, the results of the fatty acid profiles of subcutaneous fat showed that samples from the crossbreeds had higher levels of C18:1, C18:2 n6 and C18:3 n3 acids and lower levels of C16:0 and C18:0 ($P < 0.001$). This result could be associated with the longer *montanera* period, as mentioned above, and justify the significant interaction observed between breed and *montanera* time. This suggests that the feeding regime had a greater influence than the breed of the animals on the fatty acid profile, which is in line with the results of previous studies (De Smet, Raes, & Demeyer, 2004).

3.3. Correlation between fatty acids and $\delta^{13}\text{C}$ (‰) values

As previously mentioned, feeding on grass and acorn increases both some fatty acids, such as oleic, linoleic and α -linolenic acids (Daza et al., 2007), and the absolute $\delta^{13}\text{C}$ (‰) value in the fat of Iberian pigs (González-Martín et al., 1999). Therefore, it would be interesting to establish whether these correlations could also be found in fat before the *montanera* and if the correlations are stronger after the *montanera*. Furthermore, it is important to determine whether other minor fatty acids were also correlated with $\delta^{13}\text{C}$ (‰), as some fodder feeds attempt to mimic the fatty acid profile of the *montanera* feeding albeit only for major fatty acids (Delgado-Chavero et al., 2013). A better understanding of the impact of animal feed on fat composition can help to detect fraud.

Correlation between fatty acid composition and $\delta^{13}\text{C}$ (‰) was studied using Pearson's correlation coefficient; the results can be seen in Table 3. A positive correlation (i.e., the lower the absolute value of $\delta^{13}\text{C}$ (‰) the higher the fatty acid concentration) could be observed for palmitic and stearic acids, and hence for total saturated fatty acids (SFA), and for γ -linolenic acid (C18:3 n6), both before and after *montanera*. It is noteworthy that after *montanera*, Pearson correlation values were slightly lower. Fodder consumed by pigs is usually rich in saturated fatty acids, which accumulate in adipose tissue, and these samples also showed lower absolute $\delta^{13}\text{C}$ (‰) values. On the other hand, negative correlations with $\delta^{13}\text{C}$ (‰) were observed for oleic fatty acid (C18:1) and thus with total MUFA, as well as for α -linolenic acid (C18:3 n3) and docosadienoic acid (C22:2). This could indicate a pre-*montanera* feeding based on fodder rich in oleic acid and α -linolenic acid C18:3 n3 that simulates *montanera* feeding. Negative correlations were also found for three fatty acids with an odd number of carbons (C15:0, C17:0 and C17:1) that disappeared or were minimized after the *montanera*, so they were characteristic of fodder-based feeding. (See Table 4.)

After the *montanera*, new negative correlations appeared with linoleic acid (C18:2 n6), erucic acid (C22:1) or arachidonic acid (C20:4 n6). New positive correlations were observed with C20:2. Correlations with some saturated fatty acids disappeared (C20:0) or new positive ones appeared (C23:0). The new negative correlations observed for the sum of PUFA and total n-3 PUFA were remarkable. It should be recalled that after the *montanera* the more negative the value of the isotopic ratio the

Table 2
Composition of fatty acids (%) of the 3 farms in subcutaneous fat of biopsies (before the *montanera*) and in subcutaneous fat (after the *montanera*).

Fatty acids	100% Iberian								50% Iberian				P-value				
	FARM 1				FARM 2				FARM 3								
	Before M		After M		Before M		After M		Before M		After M		Breed	M	Farm	B*M	M*F
	n = 8		n = 31		n = 8		n = 30		n = 8		n = 45						
	Mean	sd	Mean	sd	Mean	sd	Mean	sd	Mean	sd	Mean	sd					
C12:0	0.06	0.003	0.05	0.006	0.07	0.004	0.06	0.005	0.09	0.009	0.06	0.008	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
C14:0	1.17	0.029	1.10	0.097	1.22	0.057	1.20	0.081	1.21	0.059	1.04	0.108	0.007	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
C14:1 n5	0.00	<0.001	0.01	0.017	0.01	0.008	0.01	0.008	0.00	0.008	0.01	0.014	0.379	0.116	<0.001	0.853	0.699
C15:0	0.05	0.004	0.04	0.007	0.06	0.004	0.05	0.018	0.05	0.003	0.04	0.020	0.077	0.011	0.002	0.299	0.138
C16:0	21.54	0.310	20.20	0.692	19.80	0.458	19.50	0.919	20.82	0.292	17.55	1.148	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
C16:1	2.38	0.097	1.95	0.192	2.65	0.112	2.47	0.195	2.45	0.215	2.10	0.200	0.080	<0.001	<0.001	0.710	0.006
C17:0	0.34	0.021	0.28	0.050	0.35	0.024	0.29	0.039	0.27	0.020	0.26	0.053	<0.001	<0.001	<0.001	0.002	0.010
C17:1	0.32	0.027	0.26	0.045	0.36	0.023	0.32	0.038	0.26	0.018	0.25	0.060	<0.001	0.001	<0.001	0.041	0.031
C18:0	11.80	0.361	10.28	0.895	8.73	0.393	8.17	0.837	10.50	0.625	7.59	0.724	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
C18:1 n9	0.17	0.155	0.01	0.054	0.06	0.119	0.00	<0.001	0.06	0.106	0.00	0.009	0.012	<0.001	<0.001	0.044	<0.001
C18:1	47.10	0.643	52.11	1.016	49.41	0.770	53.08	1.022	46.64	0.542	55.63	1.495	0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
C18:1 n7	2.84	0.306	1.87	0.286	2.74	0.296	2.10	0.295	2.71	0.294	1.67	0.423	0.001	<0.001	<0.001	0.067	0.010
C18:2 n6t	0.12	0.005	0.10	0.015	0.14	0.007	0.13	0.014	0.12	0.013	0.10	0.021	0.001	<0.001	<0.001	0.279	0.004
C18:2 n6	8.36	0.237	8.04	0.376	10.47	0.227	8.67	0.675	11.08	0.453	9.70	0.901	<0.001	<0.001	<0.001	0.209	<0.001
C18:3 n6	0.14	0.006	0.10	0.021	0.15	0.012	0.15	0.027	0.12	0.010	0.10	0.020	<0.001	<0.001	<0.001	0.651	<0.001
C18:3 n3	0.22	0.017	0.22	0.025	0.17	0.012	0.08	0.063	0.20	0.012	0.17	0.019	0.404	0.002	<0.001	0.482	<0.001
C20:0	2.03	0.091	0.59	0.077	2.15	0.112	0.70	0.092	1.96	0.078	0.83	0.155	0.212	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
C20:1 n9	0.07	0.005	1.58	0.189	0.06	0.010	1.57	0.164	0.06	0.006	1.52	0.206	0.319	<0.001	0.581	0.374	0.668
C21:0	0.11	0.033	0.07	0.028	0.09	0.016	0.14	0.014	0.11	0.011	0.13	0.017	0.010	0.030	<0.001	0.088	<0.001
C20:2 n6	0.05	0.005	0.03	0.013	0.04	0.013	0.02	0.008	0.03	0.013	0.02	0.008	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
C22:0	0.03	0.012	0.02	0.009	0.04	0.012	0.03	0.014	0.05	0.004	0.02	0.009	0.039	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
C20:3 n6	0.00	<0.001	0.03	0.007	0.00	<0.001	0.03	0.006	0.00	<0.001	0.02	0.006	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
C22:1 n9	0.57	0.024	0.57	0.051	0.64	0.035	0.66	0.074	0.68	0.027	0.64	0.071	<0.001	0.193	<0.001	0.133	0.192
C20:3 n3	0.03	0.012	0.03	0.004	0.03	0.011	0.03	0.007	0.02	0.010	0.03	0.006	0.001	<0.001	<0.001	0.249	0.508
C20:4 n6	0.09	0.004	0.01	0.007	0.10	0.008	0.08	0.015	0.10	0.007	0.01	0.011	0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
C23:0	0.01	0.009	0.09	0.010	0.02	0.008	0.03	0.005	0.01	0.009	0.08	0.010	0.010	<0.001	<0.001	0.012	<0.001
C22:2 n6	0.16	0.014	0.01	0.008	0.25	0.018	0.22	0.031	0.19	0.013	0.02	0.006	<0.001	<0.001	<0.001	0.002	<0.001
C20:5 n3	0.01	0.009	0.15	0.018	0.00	0.001	0.09	0.043	0.00	0.007	0.21	0.030	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
C22:5 n3	0.14	0.007	0.13	0.017	0.13	0.011	0.04	0.037	0.14	0.013	0.13	0.022	<0.001	<0.001	<0.001	0.019	<0.001
C22:6 n3	0.09	0.007	0.07	0.007	0.07	0.004	0.07	0.012	0.07	0.006	0.06	0.009	<0.001	<0.001	<0.001	0.641	<0.001
AGS	35.26	0.492	32.24	1.283	30.53	0.655	29.62	1.652	33.22	0.634	26.87	1.796	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
AGM	53.44	0.468	58.34	1.209	55.94	0.694	60.21	1.267	52.87	0.712	61.83	1.244	0.111	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
AGP	11.30	0.163	9.42	0.390	13.53	0.225	10.17	0.780	13.91	0.472	11.29	1.041	<0.001	<0.001	<0.001	0.928	<0.001
w3	2.30	0.095	0.97	0.078	2.38	0.107	0.93	0.119	2.20	0.073	1.25	0.179	0.001	<0.001	0.003	<0.001	<0.001
w6	9.00	0.222	8.45	0.366	11.15	0.217	9.24	0.701	11.71	0.449	10.04	0.881	<0.001	<0.001	<0.001	0.101	<0.001

M = *montanera*, B = Breed, F = Farm, sd = standard deviation.

Table 3
Correlation between the composition of $\delta^{13}\text{C}$ (‰) and the fatty acids and in subcutaneous fat of biopsies (before the *montanera*) and in subcutaneous fat after the *montanera*.

Fatty acid	Biopsies (Before the <i>montanera</i>)		Subcutaneous fat (After the <i>montanera</i>)	
	Pearson correlation with $\delta^{13}\text{C}$ (‰)	P-value	Pearson correlation with $\delta^{13}\text{C}$ (‰)	P-value
C16:0	0.656	0.001	0.563	<0.001
C18:0	0.645	0.001	0.570	<0.001
C18:1	-0.816	<0.001	-0.530	<0.001
C18:2 n6	-0.054	0.804	-0.600	<0.001
C18:3 n6	0.657	<0.001	0.459	<0.001
C18:3 n3	-0.621	0.001	-0.588	<0.001
C20:1 n9	0.282	0.183	0.238	0.010
C21:0	0.167	0.434	-0.364	<0.001
C20:2 n:6	-0.264	0.213	0.217	0.030
C22:1 n9	0.049	0.819	-0.307	<0.001
C20:4 n6	-0.058	0.789	-0.343	<0.001
C23:0	-0.096	0.656	0.354	<0.001
C22:2 n6	-0.725	<0.001	-0.336	<0.001
C22:5 n3	0.180	0.400	0.220	0.020
C22:6 n3	0.275	0.193	0.307	<0.001
SFA	0.670	<0.001	0.600	<0.001
MUFA	-0.817	<0.001	-0.509	<0.001
PUFA	-0.152	0.480	-0.606	<0.001
n-6	-0.595	0.002	-0.389	<0.001
n-3	-0.092	0.669	-0.629	<0.001

higher the correlation with feeding based on C3 plants such as acorns that contain a significant amount of C18:2 n6 (>17%) and grass that is rich in n-3 PUFA (>57%) (Tejerina et al., 2011). These new correlations

Table 4
Percentage of samples classified in accordance with their origin for model OPLS-DA for the samples of subcutaneous fat from subcutaneous fat after the *montanera* and for biopsies and subcutaneous fat as a whole for both internal and external validation.

Subcutaneous fat	Internal validation						
	Members	Correct	Farm 1	Farm 2	Farm 3	No class	
Subcutaneous fat	Farm 1	25	100%	25	0	0	0
	Farm 2	24	100%	0	24	0	0
	Farm 3	35	100%	0	0	35	0
	No class	0		0	0	0	0
	Total	84	100%	25	24	35	
	External validation						
	Members	Correct	Farm 1	Farm 2	Farm 3	No class	
	Farm 1	6	100%	6	0	0	0
	Farm 2	6	100%	0	6	0	0
	Farm 3	6	100%	0	0	9	0
No class	0		0	0	0	0	
Total	21	100%	6	6	9		
Subcutaneous fat-biopsies	Internal validation						
	Members	Correct	Farm 1	Farm 2	Farm 3	No class	
	Farm 1	32	100%	32	0	0	0
	Farm 2	32	100%	0	30	0	0
	Farm 3	41	100%	0	0	41	0
	No class	0		0	0	0	0
	Total	103	100%	32	30	41	
	External validation						
	Members	Correct	Farm 1	Farm 2	Farm 3	No class	
	Farm 1	7	100%	7	0	0	0
Farm 2	8	100%	0	8	0	0	
Farm 3	11	100%	0	0	11	0	
No class	0		0	0	0	0	
Total	26	100%	7	8	11		

pointed out that the most negative values of $\delta^{13}\text{C}$ (‰) (obtained from the samples of animals that have spent more time in *montanera*) were related to these unsaturated fatty acids, responsible for the quality of Iberian products.

3.4. Discriminant analysis

First, a discriminant analysis was performed using only NIR spectral information. A wavelength range of 1100 to 2000 nm was used, and the differentiation method used was RMS X Residual. The square root of the mean squared residual (RMS) was calculated to obtain the RMS X residual. The mathematical treatment applied was Standard Normal Variate (SNV) (2,4,4,1), where the first digit is the order of the derivative, the second is the gap over which the derivative is calculated, the third is the number of data points of a continuous or smoothed average, and finally the fourth is the second smoothing. Fat samples from the biopsies before *montanera* (8 samples per farm representing 24 animals sampled) and subcutaneous fat samples after *montanera* (30 samples from Farm 1, 31 samples from Farm 2 and 45 samples from Farm 3) were analyzed using the cams-locks. Using only the spectral information, the three fat groups, originating from the biopsied tissue, was successfully differentiated in all samples analyzed (i.e. 100%). Similarly, the three groups of extracted subcutaneous fat were also successfully discriminated. These results are similar to those reported by García-Olmo, Garrido-Varo, and De Pedro (2009) in their study on extracted fat, where different acorn feeding times (30, 60 and 180 days) were discriminated. This 100% accuracy can be attributed to the fact that subcutaneous fat spectra reflect changes in feeding regimes as they directly affect the fatty acid profile. Moreover, the extraction process allowed for greater homogeneity, avoiding the interference of water and thus improving the ability to differentiate. However, the percentages reported for direct differentiation of commercial categories or feeding regimes (acorn vs. concentrate) in subcutaneous fat were slightly lower (74 and 93%, respectively) (Horcada, Valera, Juárez, & Fernández-Cabanás, 2020).

Differentiation of the samples collected from the three farms was then carried out using $\delta^{13}\text{C}$ (‰) and fatty acid data. In this case, the screen was carried out using the subcutaneous fat samples and the whole collection of samples, without distinguishing whether they were taken

before (biopsies) or after the *montanera*. First, potential outliers were detected. For this purpose, an individual PCA was applied for each farm with a 95% confidence interval. One outlier was detected on Farm 3 and excluded for the subsequent analysis.

Subsequently, OPLS-DA was applied to the different datasets (106 subcutaneous fat samples and 130 subcutaneous fat and biopsy samples) using $\delta^{13}\text{C}$ (‰) and fatty acid values for classification. Using this data, chemometric models were built using 80% of the samples for the training set and the remaining 20% for the validation set.

The first model (Fig. 1a) corresponded to the 106 samples taken from the subcutaneous fat at the time of slaughter. The model created successfully classified all of the categories in the external and internal validation. Then, a model was built for all samples considering both sample types (biopsies and subcutaneous fat) together (Fig. 1b), giving a total of 129 samples. Again, the classification of the samples, for internal and external validation, was 100% correct. The fatty acids with the highest potency, with a p.corr greater than or close to 1, were: stearic (C18:0); docosadienoic (C22:2); palmitic (C16:0); linoleic (C18:2 n6); γ -linolenic (C18:3 n6); heneicosanoic (C21:0); DPA (C22:5 n6); eicosapentaenoic (C20:5 n3); palmitoleic (C16:1); and oleic acid (C18:1); and a $\delta^{13}\text{C}$ (‰) value greater than 9 (Fig. 2).

Correct classification was also obtained in 100% of the cases during both external and internal validation when only fatty acid values were used. However, Q2 values (which is an estimation of the predictive potential of the model) were lower than those obtained when isotopes were included in the differentiation model. This difference was observed for the differentiation models for subcutaneous fat (0.886 vs. 0.895) and for subcutaneous fat and biopsies together (0.842 vs. 0.886). This result reveals the important contribution of the isotope ratio for sample differentiation according to the duration of the *montanera* period. These results show that the statistical combination of fatty acid and $\delta^{13}\text{C}$ (‰) data could be a way to discriminate Iberian pork samples.

Nevertheless, previous studies have shown that it is possible to discriminate subcutaneous fat samples according to feed type (acorn only, acorn plus pre-mixed feed, or pre-mixed feed) with 90% accuracy. In this case fatty acids and $\delta^{13}\text{C}$ were also used (‰) but the PLS-DA algorithm was applied instead of OPLS-DA. Moreover, all of the models showed that $\delta^{13}\text{C}$ (‰) had the best predictive performance (López-Bascón et al., 2015). This is consistent with the improved predictive ability observed when $\delta^{13}\text{C}$ (‰) was included in the models.

Although there are several studies that aim to classify the Iberian pig according to its feeding regime (*bellota* - fed with acorns and grass during

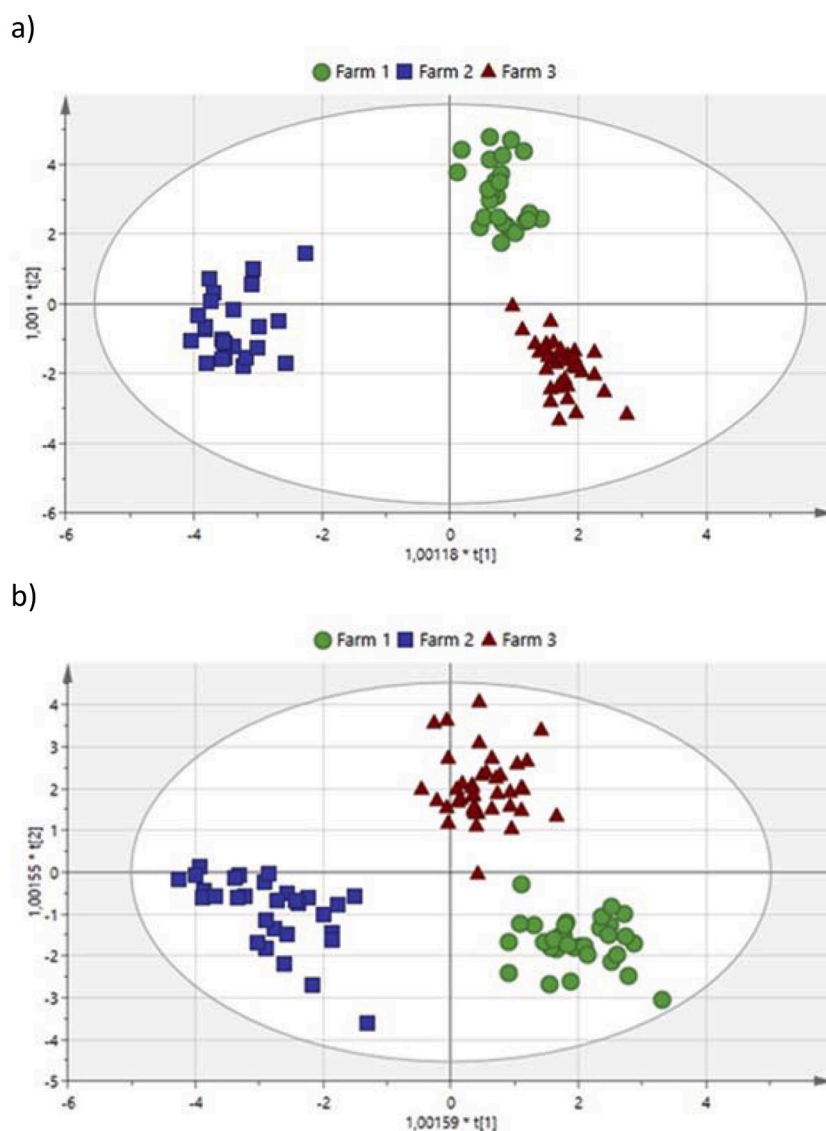


Fig. 1. Developed OPLS-DA models for a) subcutaneous fat of biopsies (before the *montanera*), b) subcutaneous fat after the *montanera*, c) biopsies and subcutaneous fat.

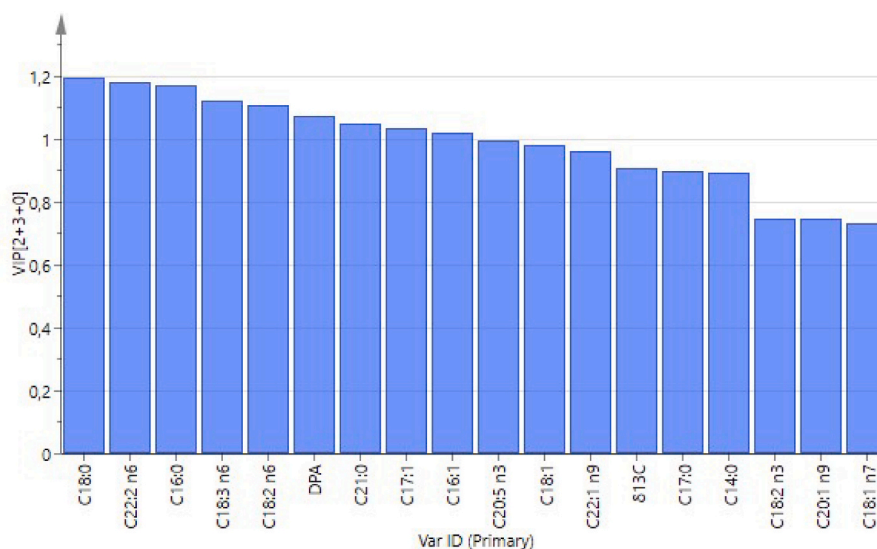


Fig. 2. The most important and significant variables for model OPLS-DA of subcutaneous fat of biopsies (before the *montanera*) and subcutaneous fat after the *montanera* as a whole.

the *montanera*; *recebo* - fed with natural food but fed formulated feed close to slaughter; and *cebo* - fed only with formulated feed) (Delgado-Chavero et al., 2013; López-Bascón et al., 2015; Recio et al., 2013; Ruiz et al., 1998), currently there are no studies that have attempted to distinguish different periods of *montanera*.

3.5. $\delta^{13}\text{C}$ (‰) and fatty acid calibration equations

3.5.1. Calibration equations

Table 5 shows the $\delta^{13}\text{C}$ (‰) and fatty acid calibration descriptors together for the whole sample set (biopsies collected before the *montanera* and subcutaneous fat collected after the *montanera* after the animals were slaughtered; 104 samples in total). This table shows the number of samples (N) used in the model after some samples were removed based on spectral (H) or chemical (T) criteria, as well as the results of the descriptors applying the best mathematical treatment.

The NIRS equations allow for the determination of the following $\delta^{13}\text{C}$ (‰) and 14 fatty acids in extracted fat samples: palmitic acid, C16:0; palmitoleic acid, C16:1; heptadecanoic acid, C17:0; cis-10

heptadecenoic acid, C17:1; stearic acid, C18:0; oleic acid, C18:1; trans-vaccenic acid, C18:1 n7; linoleic acid, C18:2; γ -linolenic acid, C18:3 n6; α -linolenic acid, C18:3 n3; eicosenoic acid, C20:1; eicosapentaenoic acid, C20:5 n3; heneicosanoic acid, C21:0; erucic acid, C22:1; docosadienoic acid, C22:2 n6; and DPA, C22:5 n3. Furthermore, it is also possible to determine five fatty acid sums: Σ of saturated fatty acids (SFA), Σ of monounsaturated fatty acids (MUFA) and Σ of polyunsaturated fatty acids (PUFA) together with Σ of PUFA n3 and Σ of PUFA n6. The NIR calibration descriptors shown in Table 5 were found to be satisfactory, with $\text{RSQ} > 0.8$ for almost all of the calibrated parameters. It is remarkable that the application ranges and standard deviations of these mathematical models for the determination of $\delta^{13}\text{C}$ (‰) and fatty acids is similar and comparable to the results obtained for $\delta^{13}\text{C}$ (‰) by isotope ratio mass spectrometry (IRMS) (Table 1) and for fatty acids by gas chromatography (Table 2). Therefore, they have useful statistical values when applying the models to unknown samples.

A novel approach is the determination of the $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ isotope ratio expressed as $\delta^{13}\text{C}$ (‰) using NIRS, especially considering the importance of this parameter and the economic cost for potential users. Although the

Table 5

NIR calibration statistics of fatty acids and stable carbon isotopes in Iberian pig biopsies and subcutaneous fat.

Constituent	N	Mean	Est. Min	Est. Max	SD	SEC	SEP	RSQ
$\delta^{13}\text{C}$	99	26.17	24.71	27.62	0.48	0.21	0.40	0.81
C16:0	101	19.19	14.52	23.86	1.56	0.33	1.05	0.96
C16:1	102	2.21	1.35	3.06	0.28	0.14	0.24	0.77
C17:1	101	0.28	0.12	0.43	0.05	0.03	0.05	0.59
C18:0	99	8.89	4.32	13.47	1.53	0.42	0.78	0.92
C18:1	98	53.11	44.66	61.57	2.82	0.83	1.69	0.91
C18:1 n7	99	19.84	6.10	33.59	4.58	2.30	3.84	0.75
C18:2 n6	100	9.01	5.94	12.07	1.02	0.34	0.87	0.89
C18:3 n3	99	0.92	0.00	2.43	0.50	0.20	0.35	0.83
C18:3 n6	102	0.17	0.00	0.35	0.06	0.03	0.06	0.81
C20:1 n9	98	1.34	0.00	2.98	0.55	0.21	0.48	0.85
C20:5 n3	84	0.16	0.00	0.32	0.05	0.01	0.04	0.96
C21:0	102	0.11	0.01	0.22	0.03	0.02	0.03	0.69
C22:1 n9	101	0.62	0.43	0.82	0.06	0.04	0.05	0.69
C22:2 n6	97	0.10	0.00	0.39	0.10	0.04	0.09	0.83
SFA	99	29.95	21.00	38.89	2.98	0.56	1.58	0.97
PUFA	100	10.76	6.65	14.86	1.37	0.43	1.18	0.90
MUFA	98	59.55	51.23	67.86	2.77	0.81	1.63	0.91
n3	98	1.26	0.00	2.70	0.48	0.21	0.35	0.81
n6	100	9.50	6.35	12.65	1.05	0.28	0.87	0.93
$\delta^{13}\text{C}$	99	26.17	24.71	27.62	0.48	0.21	0.40	0.81

N = number of samples worked. SEC = Standard calibration error. SD = standard deviation. RSQ = correlation coefficient. SEP = Standard prediction error.

determination of the major fatty acids C16:0, C18:0, C18:1, C18:2, and C20:1, SFAs, MUFAs, and PUFAs by NIR spectroscopy has been previously reported (De Pedro et al., 1992, 1995; Fernández-Cabanás et al., 2007; Gonzalez-Martin et al., 2003; Pérez-Juan et al., 2010; Zamora-Rojas, Garrido-Varo, De Pedro-Sanz, Guerrero-Ginel, & Pérez-Marín, 2013), this technique has not been used to quantify the minor fatty acids

included in this study. Furthermore, the calibration equations can be applied to determine these compounds in the extracted fat samples collected at different times during the pig fattening process.

The NIR wavelength range is associated with combinations of C—H stretching with other vibrational modes (Westad, Schmidt, & Kermit, 2008). Thus, the C—H bond, which is a fundamental constituent of fatty

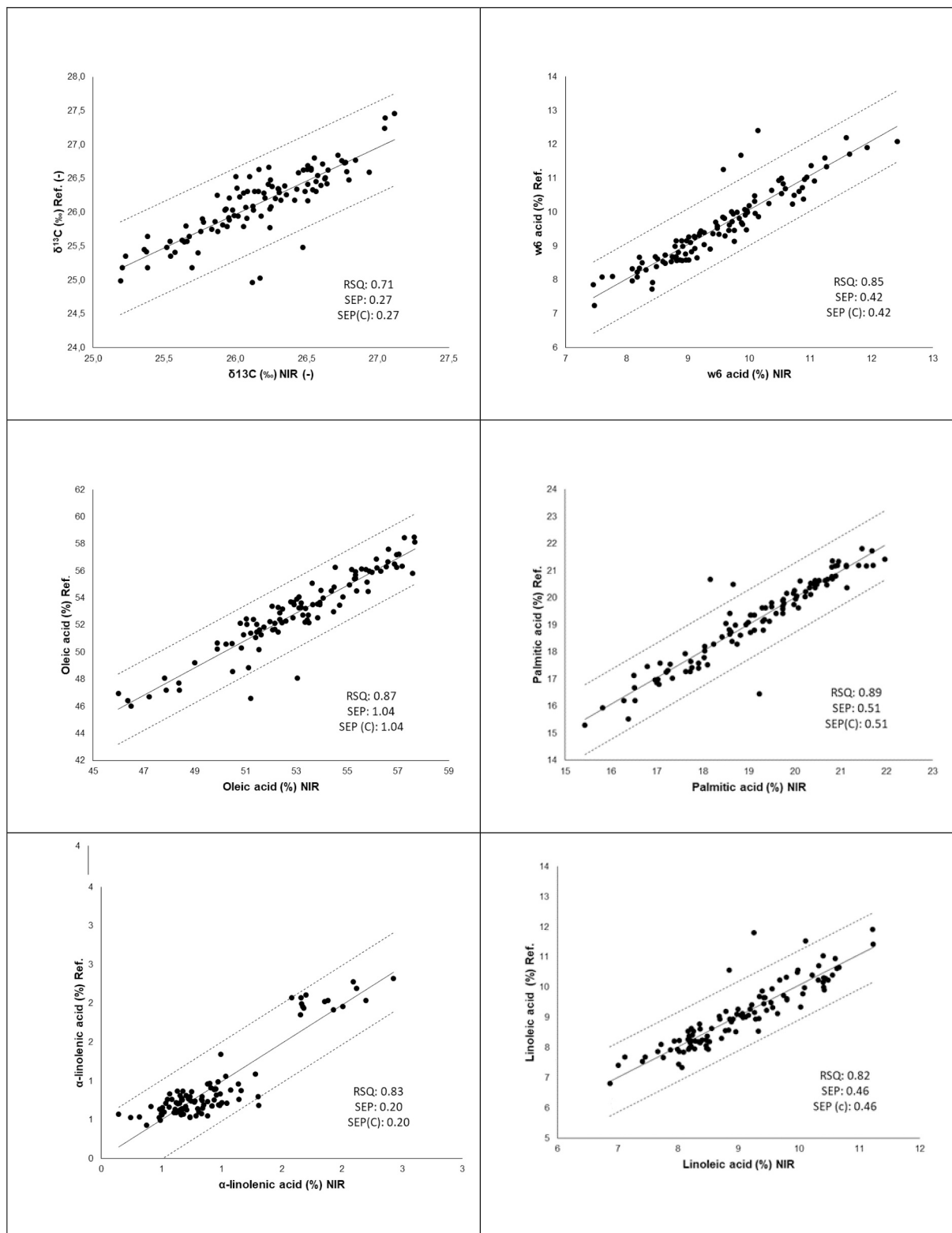


Fig. 3. Internal validation. Comparative study of $\delta^{13}\text{C}$ and fatty acids.

acid molecules, is strongly absorbs at wavelengths near 1200, 1400, 1750, 2310 and 2340 nm (Williams & Norris, 1987). Furthermore, the 2310–2340 region corresponds to the C–H bond combination bands and the absorption produced in the 1720–1760 region corresponds to the first overtone of that bond (Gonzalez-Martin et al., 2003; Shenk, Westerhaus, & Workman, 1992; Zamora-Rojas et al., 2013). Some authors attributed the absorption at 1210 nm to the second overtone of the CH₂ bond (Osborne, Fearn, & Hindle, 1993). Absorption in the region of 2150–2190 and at 1680 nm indicates the presence of cis-double bonds, i. e., unsaturated fatty acids (Garrido-Varo, Carrete, & Fernández-Cabanas, 1998). Regarding $\delta^{13}\text{C}$ (‰), the regression model can be justified using the correlation between concentration and measurement at different wavelengths in accordance to the equation $y = \beta_0 + \beta_1 X_{\lambda 1} + \beta_2 X_{\lambda 2} + \beta_3 X_{\lambda 3} + \dots + \beta_n X_{\lambda n}$, where β are the coefficients and $X_{\lambda 1}, X_{\lambda 2}, X_{\lambda 3}, \dots, X_{\lambda n}$, are the wavelengths where there is correlation. $\delta^{13}\text{C}$ (‰) has β values of 377.3 at 1720 nm (corresponding to the C–O band of the oil) and 197.9 to 1948 nm (corresponding to the presence of C=O stretching bands, a second CO₂R overtone) among others.

3.5.2. Internal and external validation

NIR calibration models were internally assessed by means of cross-validation. In this method, the sample calibration set is divided into a number of subsets, which in this study is seven. Of the latter, six were used for the calibration set and one for the prediction set. The NIRS calibration model using MPLS allows for the determination of $\delta^{13}\text{C}$ (‰) and fatty acids in subcutaneous fat (biopsies before *montanera* and subcutaneous fat after *montanera*) by recording NIR spectra in melted fat in cam-lock cells. Table 5 shows the standard error of prediction (SEP) of the models for which the difference between SEP and the standard error of calibration (SEC) was lower and the RSQ value was higher. Comparison of the NIRS data obtained using the mathematical models and the reference data for $\delta^{13}\text{C}$ (‰) and some fatty acids are shown in Fig. 3. It can be seen that the validation RSQ values were higher than 0.8 and the SEP and SEP (C) values were similar. The RSQ values observed for both the calibration and validation of palmitic, stearic, linoleic and linolenic acids were either similar to those previously reported in the subcutaneous fat of Iberian pigs (Gonzalez-Martin et al., 2003; Pérez-Juan et al., 2010; Zamora-Rojas et al., 2013) or higher, like the value obtained for C18:3 n3 (González-Martín et al., 2021).

The robustness of the method was confirmed by using NIRS technology to analyze 26 new samples of subcutaneous fat (from the biopsies collected before *montanera* and the subcutaneous fat collected after *montanera*). Student's *t*-test analysis for paired values compared the $\delta^{13}\text{C}$ (‰) and fatty acid values obtained with the reference methods (mass spectrometry and chromatography) with those predicted in the external validation with the NIRS model. The *P*-values obtained were above the minimum level of significance (0.05). Therefore, the null hypothesis is accepted and it can be stated that there is no difference between the $\delta^{13}\text{C}$ (‰) and fatty acid values generated using the different methods. From these results it can be concluded that the NIRS technique is a useful alternative to isotopic mass spectrometry and gas chromatography for the determination of all the parameters studied in subcutaneous fat samples.

4. Conclusion

Using only NIR spectra or fatty acid and stable isotopes data, it was possible to distinguish between farms employing different feeding regimes (length of the *montanera* period), with 100% of the samples being classified correctly. Moreover, the differentiation was possible in both samples types: fat extracted from biopsied tissue (collected before *montanera*) and subcutaneous fat taken from pig carcasses (after *montanera*). Also, using NIR spectroscopy, it was possible to calibrate 14 fatty acids, the sums of the main fatty acid groups and the $\delta^{13}\text{C}$ ratio (‰). Among the fatty acids that could be calibrated were those that had a major contribution to the OPLS-DA model for sample differentiation on

a farm-by-farm basis. Also, it was possible to calibrate most of that fatty acids showing a higher correlation with $\delta^{13}\text{C}$ (‰), or with quality Iberian products, such as C18:1, C18:2 and C18:3. These results prove that NIR spectroscopy, together with stable carbon isotopes, is a powerful technique that can be used to differentiate Iberian pork samples. Thus, the Iberian pork industry could use NIR spectroscopy as a routine tool to analyze subcutaneous fat at slaughter. NIRS would allow $\delta^{13}\text{C}$ (‰) to be determined and correlated with the diet during the *montanera* as well as the fatty acids responsible for the production of quality meat.

Funding

This research was funded by grant 18VEUH 463 AC06, kindly awarded by the Salamanca County Council (Spain).

Declaration of Competing Interest

None.

Acknowledgments

We are grateful to "Carrasco Ibéricos" Guijuelo (Salamanca) for their collaboration and to the Salamanca County Council (Spain) for financing the project.

References

- Alonso, R., Rodríguez-Estévez, V., Domínguez-Vidal, A., Ayora-Cañada, M. J., Arce, L., & Valcárcel, M. (2008). Ion mobility spectrometry of volatile compounds from Iberian pig fat for fast feeding regime authentication. *Talanta*, 76(3), 591–596. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.03.052>.
- Antequera, T., García, C., López, C., Ventanas, J., Asensio, M. A., & Córdoba, J. J. (1994). Evolution of different physico-chemical parameters during ripening Iberian ham from Iberian (100 p. 100) and Iberian x Duroc pigs (50 p. 100). *Revista Española de Ciencia y Tecnología de Alimentos (España)*, 34(2), 178–190.
- Arce, L., Domínguez-Vidal, A., Rodríguez-Estévez, V., López-Vidal, S., Ayora-Cañada, M. J., & Valcárcel, M. (2009). Feasibility study on the use of infrared spectroscopy for the direct authentication of Iberian pig fattening diet. *Analytica Chimica Acta*, 636(2), 183–189. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.01.058>.
- Bahar, B., Moloney, A. P., Monahan, F. J., Harrison, S. M., Zazzo, A., Scrimgeour, C. M., ... Schmidt, O. (2009). Turnover of carbon, nitrogen, and sulfur in bovine longissimus dorsi and psoas major muscles: Implications for isotopic authentication of meat. *Journal of Animal Science*, 87(3), 905–913. <https://doi.org/10.2527/jas.2008-1360>.
- Bahar, B., Monahan, F. J., Moloney, A. P., O'Kiely, P., Scrimgeour, C. M., & Schmidt, O. (2005). Alteration of the carbon and nitrogen stable isotope composition of beef by substitution of grass silage with maize silage. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 19(14), 1937–1942. <https://doi.org/10.1002/rcm.2007>.
- Barea, R., Isabel, B., Nieto, R., López-Bote, C., & Aguilera, J. F. (2013). Evolution of the fatty acid profile of subcutaneous back-fat adipose tissue in growing Iberian and landrace x large white pigs. *Animal*, 7(4), 688–698. <https://doi.org/10.1017/S175173111200184X>.
- Bayés-García, L., Tres, A., Vichi, S., Calvet, T., Cuevas-Diarte, M. A., Codony, R., ... Guardiola, F. (2016). Authentication of Iberian dry-cured ham: New approaches by polymorphic fingerprint and ultrahigh resolution mass spectrometry. *Food Control*, 60, 370–377. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.07.047>.
- Boletín Oficial del Estado. (2014). *Real Decreto 4/2014, de 10 de enero, por el que se aprueba la norma de calidad para la carne, el jamón, la paleta y la caña de lomo ibérico*. BOE: Madrid, Spain.
- Bosch-Puig, L., Puigvert-Colomer, X., Tor-Naudí, M., Villalba-Mata, D., & Estany-Illa, J. (2008). Biopsia de lomo. *Suís. Técnicas Clínicas*, 15, 42–45.
- Cava López, R., & Andrés Nieto, A. (2001). La obtención de materia prima de una adecuada aptitud tecnológica. Características de la grasa determinantes de la calidad del jamón: Influencia de los factores genéticos y ambientales. In *Tecnología del jamón Ibérico* (pp. 99–129). Mundi-Prensa.
- Cava, R., Ruiz, J., López-Bote, C., Martín, L., García, C., Ventanas, J., & Antequera, T. (1997). Influence of finishing diet on fatty acid profiles of intramuscular lipids, triglycerides and phospholipids in muscles of the Iberian pig. *Meat Science*, 45(2), 263–270. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(96\)00102-7](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(96)00102-7).
- Daza, A., Ruiz-Carrascal, J., Olivares, A., Menoyo, D., & López-Bote, C. J. (2007). Fatty acids profile of the subcutaneous Backfat layers from Iberian pigs raised under free-range conditions. *Food Science and Technology International*, 13(2), 135–140. <https://doi.org/10.1177/1082013207077925>.
- De Niro, M. J., & Epstein, S. (1978). Influence of diet on the distribution of carbon isotopes in animals. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 42(5), 495–506. [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(78\)90199-0](https://doi.org/10.1016/0016-7037(78)90199-0).

- De Pedro, E., Garrido, A., Bares, I., Casillas, M., & Murray, I. (1992). Application of near infrared spectroscopy for quality control of Iberian pork industry. *Near Infrared Spectroscopy*, 345–348.
- De Pedro, E., Garrido, A., Lobo, A., Dardenne, P., & Murray, I. (1995). Objective classification of Iberian pig carcasses: GC versus NIR. *Leaping Ahead with Near Infrared Spectroscopy*, 291–295.
- De Smet, S., Raes, K., & Demeyer, D. (2004). Meat fatty acid composition as affected by fatness and genetic factors: A review. *Animal Research*, 53(2), 81–98. <https://doi.org/10.1051/animres:2004003>.
- Delgado-Chavero, C. L., Zapata-Márquez, E., García-Casco, J. M., & Paredes-Torronteras, A. (2013). Statistical model for classifying the feeding systems of Iberian pigs through gas chromatography (GC-FID) and isotope ratio mass spectrometry (GC-C-IRMS). *Grasas y Aceites*, 64(2), 157–165. <https://doi.org/10.3989/gya.130412>.
- Fernández-Cabanás, V. M., Garrido-Varo, A., García Olmo, J., Pedro, E. D., & Dardenne, P. (2007). Optimisation of the spectral pre-treatments used for Iberian pig fat NIR calibrations. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 87(1), 104–112. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2006.10.005>.
- García-Olmo, J., Garrido-Varo, A., & De Pedro, E. (2009). Classification of real farm conditions Iberian pigs according to the feeding regime with multivariate models developed by using fatty acids composition or NIR spectral data. *Grasas y Aceites*, 60(3), 233–237. <https://doi.org/10.3989/gya.130408>.
- Garrido-Varo, A., Carrete, R., & Fernández-Cabanás, V. (1998). Use of difference near infrared reflectance spectra to extract relevant information from the spectra of agro-food products. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 6(1), 89–95. <https://doi.org/10.1255/jnirs.125>.
- Gilles, G. (2009). Dry cured ham quality as related to lipid quality of raw material and lipid changes during processing: A review. *Grasas y Aceites*, 60(3), 297–307. <https://doi.org/10.3989/gya.130908>.
- 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(2), 713–719. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(02\)00273-5](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(02)00273-5).
- González-Martín, I., González Pérez, C., Hernández-Méndez, J., & Sánchez González, C. (2001). Differentiation of dietary regime of Iberian swine by means of isotopic analysis of carbon and Sulphur in hepatic tissue. *Meat Science*, 58(1), 25–30. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(00\)00126-1](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(00)00126-1).
- González-Martín, I., González-Pérez, C., Hernández Méndez, J., Marqués-Macias, E., & Sanz Poveda, F. (1999). Use of isotope analysis to characterize meat from Iberian-breed swine. *Meat Science*, 52(4), 437–441. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(99\)00027-3](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(99)00027-3).
- González-Martín, I., González-Pérez, C., Hernández-Méndez, J., Álvarez-García, N., & Merino Lázaro, S. (2002). Determination of fatty acids in the subcutaneous fat of Iberian breed swine by near infrared spectroscopy. A comparative study of the methods for obtaining Total Lipids: Solvents and melting with microwaves. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 10(4), 257–268. <https://doi.org/10.1255/jnirs.342>.
- González-Martín, M. I., González, C., Hernández Méndez, J., Recio Hernández, C., & Sabio Rey, E. (1997). *Método para la caracterización y diferenciación del cerdo ibérico en función de la dieta. Boletín oficial de la propiedad industrial. G.O.I.N. 30/72/2644 (Patent No. G.O.I.N. 30/72/2644)*.
- González-Martín, M. I., Vicente Palacios, V., Revilla, I., Vivar-Quintana, A. M., & Miguel Hernández-Hierro, J. (2017). Discrimination between cheeses made from cow's, ewe's and goat's milk from unsaturated fatty acids and use of the canonical biplot method. *Journal of Food Composition and Analysis*, 56, 34–40. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2016.12.005>.
- González-Martín, M. I., Escudero, O., Hernández-Jiménez, M., Revilla, I., Vivar-Quintana, A. M., Martínez-Martín, I., & Hernández-Ramos, P. (2021). Prediction of stable isotopes and fatty acids in subcutaneous fat of Iberian pigs by means of NIR: A comparison between benchtop and portable systems. *Talanta*, 224, Article 121817. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121817>.
- Hervás, C., Garrido, A., Lucena, B., García, N., & De Pedro, E. (1994). Near infrared spectroscopy for classification of Iberian pig carcasses using an artificial neural network. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 2(4), 177–184. <https://doi.org/10.1255/jnirs.44>.
- Horcada, A., Valera, M., Juárez, M., & Fernández-Cabanás, V. M. (2020). Authentication of Iberian pork official quality categories using a portable near infrared spectroscopy (NIRS) instrument. *Food Chemistry*, 318, 126–133. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126471>.
- López-Bascón, M. A., Priego-Capote, F., Calderón-Santiago, M., Sánchez de Medina, V., Moreno-Rojas, J. M., García-Casco, J. M., & Luque de Castro, M. D. (2015). Determination of fatty acids and stable carbon isotopic ratio in subcutaneous fat to identify the feeding regime of Iberian pigs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(2), 692–699. <https://doi.org/10.1021/jf505189x>.
- Martens, H., & Naes, T. (1989). *Multivariate calibration* (John Wiley & Sons).
- Melgar, J., Cid, C., Astiasarán, I., & Bello, J. (1991). Influencia de la alimentación del cerdo ibérico en las características de los compuestos relacionados con la grasa del jamón curado. <https://dadun.unav.edu/handle/10171/37706>.
- Monahan, F. J., Buckley, D. J., Morrissey, P. A., Lynch, P. B., & Gray, J. I. (1992). Influence of dietary fat and α -tocopherol supplementation on lipid oxidation in pork. *Meat Science*, 31(2), 229–241. [https://doi.org/10.1016/0309-1740\(92\)90042-3](https://doi.org/10.1016/0309-1740(92)90042-3).
- Murrieta, C. M., Hess, B. W., & Rule, D. C. (2003). Comparison of acidic and alkaline catalysts for preparation of fatty acid methyl esters from ovine muscle with emphasis on conjugated linoleic acid. *Meat Science*, 65(1), 523–529. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(02\)00244-9](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(02)00244-9).
- Niñoles, L., Clemente, G., Ventanas, S., & Benedito, J. (2007). Quality assessment of Iberian pigs through backfat ultrasound characterization and fatty acid composition. *Meat Science*, 76(1), 102–111. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2006.10.018>.
- Nørgaard, L., Haunstrup, I., Petersen, M., Weimann, J., & Sørensen, K. (2014). Chemometric terminology for qualitative and quantitative analysis - IQ2. *InFocus*, 1, 15.
- Osborne, B. G., Fearn, T., & Hindle, P. H. (1993). *Practical NIR spectroscopy with applications in food and beverage analysis*. Longman Scientific and Technical <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19931464035>.
- Pascual, J. V., Rafecas, M., Canela, M. A., Boatella, J., Bou, R., Bauceles, M. D., & Codony, R. (2006). Effect of increasing amounts of a linoleic-rich dietary fat on the fat composition of four pig breeds. Part I: Backfat fatty acid evolution. *Food Chemistry*, 96(4), 538–548. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.02.042>.
- Pérez-Juan, M., Afseth, N. K., González, J., Díaz, I., Gispert, M., Furnols, M. F., ... Realini, C. E. (2010). Prediction of fatty acid composition using a NIRS fibre optics probe at two different locations of ham subcutaneous fat. *Food Research International*, 43(5), 1416–1422. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.04.006>.
- Prieto, N., Roehe, R., Lavín, P., Batten, G., & Andrés, S. (2009). Application of near infrared reflectance spectroscopy to predict meat and meat products quality: A review. *Meat Science*, 83(2), 175–186. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2009.04.016>.
- Recio, C., Martín, Q., & Raposo, C. (2013). GC-C-IRMS analysis of FAMES as a tool to ascertain the diet of Iberian pigs used for the production of pork products with high added value. *Grasas y Aceites*, 64(2), 181–190. <https://doi.org/10.3989/gya.130712>.
- Rey, A. I., Daza, A., López-Carrasco, C., & López-Bote, C. J. (2006). Feeding Iberian pigs with acorns and grass in either free-range or confinement affects the carcass characteristics and fatty acids and tocopherols accumulation in longissimus dorsi muscle and backfat. *Meat Science*, 73(1), 66–74. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2005.10.018>.
- Ruiz, J., Cava, R., Antequera, T., Martín, L., Ventanas, J., & López-Bote, C. J. (1998). Prediction of the feeding background of Iberian pigs using the fatty acid profile of subcutaneous, muscle and hepatic fat. *Meat Science*, 49(2), 155–163. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(97\)00136-8](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(97)00136-8).
- Ruiz-Carrascal, J., Ventanas, J., Cava, R., Andrés, A. I., & García, C. (2000). Texture and appearance of dry cured ham as affected by fat content and fatty acid composition. *Food Research International*, 33(2), 91–95. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(99\)00153-2](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(99)00153-2).
- Sánchez del Pulgar, J., Soukoulis, C., Carrapiso, A. I., Cappellin, L., Granitto, P., Aprea, E., ... Biasioli, F. (2013). Effect of the pig rearing system on the final volatile profile of Iberian dry-cured ham as detected by PTR-ToF-MS. *Meat Science*, 93(3), 420–428. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.10.003>.
- Shenk, J. S., & Westerhaus, M. O. (1996). *Calibration the ISI way. Near Infrared Spectroscopy: The Future Waves* (pp. 198–202).
- Shenk, J. S., Westerhaus, M. O., & Workman, J. J. (1992). *Application of NIR spectroscopy to agricultural products (D.A. Burns). Ciurczak, Handbook of Near Infrared Analysis, Practical Spectroscopy Series*. Marcel Dekker. <https://ci.nii.ac.jp/naid/10008263819/>.
- Tejerina, D., García-Torres, S., Cabeza de Vaca, M., Vázquez, F. M., & Cava, R. (2011). Acorns (*Quercus rotundifolia* lam.) and grass as natural sources of antioxidants and fatty acids in the "montañera" feeding of Iberian pig: Intra- and inter-annual variations. *Food Chemistry*, 124(3), 997–1004. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.07.058>.
- Ventanas, J., Andrés, A. I., Cava, R., Tejada, J. F., & Ruiz, J. (1999). Composición y características de la grasa en el cerdo Ibérico e influencia sobre la calidad del jamón. *Cárnica*, 55–59.
- Ventanas, S., Ventanas, J., Jurado, Á., & Estévez, M. (2006). Quality traits in muscle biceps femoris and back-fat from purebred Iberian and reciprocal Iberian x Duroc crossbred pigs. *Meat Science*, 73(4), 651–659. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2006.03.009>.
- Viera Alcaide, I., Vicario, I. M., Escudero Gilete, M. L., Graciani Constante, E., & León Camacho, M. (2008). A multivariate study of the triacylglycerols composition of the subcutaneous adipose tissue of Iberian pig in relation to the fattening diet and genotype. *Grasas y Aceites*, 59, 327–336. <https://doi.org/10.3989/gya.2008.v59.i4.526>.
- Westad, F., Schmidt, A., & Kermit, M. (2008). Incorporating chemical band-assignment in near infrared spectroscopy regression models. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 16(3), 265–273.
- Williams, P., & Norris, K. (1987). *Near-infrared technology in the agricultural and food industries*. American Association of Cereal Chemists Inc. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19892442443>.
- Worley, B., & Powers, R. (2013). Multivariate analysis in metabolomics. *Current Metabolomics*, 1(1), 92–107.
- Zamora-Rojas, E., Garrido-Varo, A., De Pedro-Sanz, E., Guerrero-Ginel, J. E., & Pérez-Marín, D. (2011). Monitoring NIRS calibrations for use in routine meat analysis as part of Iberian pig-breeding programs. *Food Chemistry*, 129(4), 1889–1897. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.05.139>.
- Zamora-Rojas, E., Garrido-Varo, A., De Pedro-Sanz, E., Guerrero-Ginel, J. E., & Pérez-Marín, D. (2013). Prediction of fatty acids content in pig adipose tissue by near infrared spectroscopy: At-line versus in-situ analysis. *Meat Science*, 95(3), 503–511. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.05.020>.
- Zamora-Rojas, E., Pérez-Marín, D., De Pedro-Sanz, E., Guerrero-Ginel, J. E., & Garrido-Varo, A. (2012). In-situ Iberian pig carcass classification using a micro-electro-mechanical system (MEMS)-based near infrared (NIR) spectrometer. *Meat Science*, 90(3), 636–642. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2011.10.006>.

Artículo 3 / Article 3.

Título / Title: Authentication of the *Montanera* Period on Carcasses of Iberian Pigs by Using Analytical Techniques and Chemometric Analyses. (*Autenticación del periodo de montanera de las canales de cerdo ibérico mediante el uso de técnicas analíticas y análisis quimiométricos*)

Autores / Authors: Miriam Hernández-Jiménez, Isabel Revilla, Lourdes Arce, María José Cardador, Rocío Ríos-Reina, Inmaculada González-Martín and Ana María Vivar-Quintana

Revista / Journal: *Animals* **2021, 11, 2671.**

- (MDPI Academic Open Access Publishing) (Enviado: 30 de julio de 2021. Aceptado: 8 de septiembre de 2021. Publicado: 11 de septiembre de 2021).

- (MDPI Academic Open Access Publishing) (Submitted: 30 July 2021. Accepted: 8 September 2021. Publication date: 11 September 2021).

<https://doi.org/10.3390/ani11092671>.

Índices de calidad / Quality indices:

Cuartil / Quartile: Q1

Área / Area: Agriculture, Dairy y Animal Science

Posición de la revista / Position of the journal: 13/62

Factor de impacto / Impact factor: 3.231 (2021)

Número de citas / Number of citations :0 Google Scholar / 0 Web of Science (21 March 2023)

Resumen

En el mercado de productos derivados del cerdo ibérico existen cuatro categorías: bellota 100% ibérico, ibérica bellota, cebo de campo y cebo (Real Decreto 4/2014). La denominación bellota se corresponde con el sistema tradicional de producción basado en mantener a los animales en libertad en la dehesa durante la última etapa de vida, donde se alimentan únicamente a base de los recursos naturales de esta (bellota y pasto). A su vez, este régimen de alimentación otorga dos etiquetados diferentes en función de la raza, dependiendo si el animal es raza 100% ibérica o raza cruzada 50% Ibérica-Duroc. El tiempo de montanera es variable dependiendo de los recursos de cada campaña. Un mayor tiempo en montanera se ha relacionado con una mayor calidad del producto. Para la industria del cerdo ibérico, la autenticación de la materia prima es de gran importancia, sin embargo, el método oficial solo contempla inspecciones visuales puntuales. Por ello, la investigación en este campo se ha centrado en el desarrollo de métodos analíticos que puedan ser utilizados para autenticar el sistema de alimentación y raza del cerdo ibérico.

Son diversas las técnicas analíticas aplicadas a la grasa del animal tanto para la determinación cuantitativa del perfil lipídico como cualitativas para la discriminación en función de la raza o del tipo de alimentación. Sin embargo, apenas hay estudios previos que diferencien las muestras según los días en montanera. Una de las técnicas que presenta grandes ventajas para estos fines es la espectroscopía NIR debido a que es rápida, económica y podría implementarse en línea en los mataderos o salas de despiece, ya que no requiere ninguna preparación previa de las muestras. Otra técnica es la espectrometría de movilidad iónica (IMS) acoplada a la cromatografía de gases (GC), la cual permite la caracterización de compuestos volátiles en las muestras con una preparación mínima de la misma. El inconveniente de ambas técnicas es la gran cantidad de datos que se obtienen, lo que hace necesario el uso de herramientas quimiométricas para su interpretación.

El objetivo principal de este trabajo fue estudiar el potencial de la espectroscopía de infrarrojo cercano (NIRS) y la espectrometría de movilidad iónica acoplada a la cromatografía de gases (GC-IMS) para lograr la clasificación de las canales de cerdo ibérico en función de la raza y del tiempo que los animales han pasado en montanera.

Las canales muestreadas fueron etiquetadas bajo la normativa vigente lo que garantiza la autenticidad del régimen de alimentación y raza. Un total de 60 de las canales pertenecían a la categoría "bellota 100% ibérico" habiendo permanecido 30 de los animales 68 días en montanera y otros 30 animales 84 días en montanera. Las 45 canales restantes pertenecían a la categoría "ibérico bellota" siendo animales 50% ibéricos alimentados 120 días en montanera.

Se ensayaron diferentes métodos de muestreo para determinar la posible influencia de la metodología utilizada en la toma de muestra sobre los resultados del análisis GC-IMS. El primer método de muestreo aplicado fue el método estándar en el sector, en el que se realiza un corte a pocos centímetros del rabo tomando toda la profundidad de la grasa. El segundo método de muestreo se llevó a cabo mediante la inserción de una aguja desechable estéril en la misma zona

del coxis con la finalidad de impregnar la aguja de grasa. Para este tipo de muestreo, se llevó a cabo una comparativa de inserción a tres temperaturas diferentes (20-24°C, 5-7°C y 0-1°C). El equipo utilizado para el análisis GC-IMS fue el FlavourSpec[®] Instrument GC-IMS Static Headspace (SHS). El registro mediante espectroscopía NIR se llevó a cabo con el equipo Foss 5000 en la muestra intacta por aplicación directa de una sonda de fibra óptica sobre la superficie de la grasa, registrando los espectros entre 1.100-2.000nm. Posteriormente se eliminó la piel y la posible carne magra y se procedió a homogeneizar y fundir la muestra para llevar el registro de la grasa extraída mediante una sonda para muestras líquidas “cam-lock”, entre 1.100-2.498nm de longitud de onda.

Los datos de cada una de las técnicas aplicadas se analizaron con diferentes procedimientos estadísticos teniendo en cuenta el factor raza (100% ibérico puro vs. 50% cruces Ibérico-Duroc) y el periodo de montanera (68, 84 y 120 días). Para el caso de los datos GC-IMS se tomó la huella espectral completa generada por los volátiles presentes en la muestra. Se aplicaron pretratamientos previos, se organizaron los datos en una matriz, para proceder al posterior análisis de componentes principales y análisis discriminante lineal (LDA) y por último se le aplicó el método de k-vecino más cercano (kNN) usando K = 3. Los datos se dividieron en un conjunto de entrenamiento con el 80% de las muestras de cada categoría y un conjunto de validación con el 20% de las muestras restantes. En el caso del análisis estadístico de los espectros NIRS se utilizó el método residual RMS-X (Residual Mean Squares) de reconocimiento de patrones supervisado en el que se corroboran las clases utilizando datos residuales. Los espectros también habían sido sometidos a pretratamientos espectrales tales como derivadas y suavizados.

En cuanto a los resultados de la metodología de muestreo para posterior análisis de GC-IMS se pudo determinar que tanto el tipo de muestreo como la temperatura de inserción en el muestreo con aguja influía significativamente en la huella espectral. Para posteriores análisis en todo el conjunto de muestras, se estableció como muestreo más adecuado el sistema tradicional y posterior homogeneización de la grasa y la temperatura de inserción de las agujas entre 0-1°C.

Los resultados de clasificación según los días de montanera (3 grupos) a partir de la técnica GC-IMS aplicada a grasa subcutánea homogeneizada mostraron un 99,4% de aciertos en calibración y un 78,6% en predicción. Para el caso del muestreo con agujas insertadas en la grasa a temperatura de 0-1°C el porcentaje de aciertos fue del 100% de las muestras en calibración y el 95,2% en predicción. En el caso de las clasificaciones en función de la raza (2 grupos) se obtuvieron resultados de acierto ligeramente inferiores con un 98,2% en calibración y 80,9% en predicción para el muestreo de grasa homogeneizada y del 98,7% para calibración y 92,9% para predicción cuando el muestreo se hizo con agujas. Para ambos factores se obtuvieron mejores porcentajes de clasificación para el muestreo con aguja.

Para la creación de los modelos de clasificación mediante los espectros NIRS se ensayaron diferentes pretratamientos matemáticos, siendo el tratamiento SNV (2,4,4,1) el que permitió obtener los mejores resultados, tanto en la calibración como en la predicción, para ambos factores estudiados. El registro de los espectros se llevó a cabo mediante dos sondas diferentes que permiten obtener dos rangos espectrales diferentes. Los datos obtenidos permitieron concluir que los mejores resultados, en cuanto a porcentaje de muestras correctamente

clasificadas, se alcanzaron con el intervalo espectral comprendido entre 1.100-2.000 nm. Es en esta zona espectral donde se encontraron la mayoría de las bandas de absorción responsables de la diferenciación de los factores estudiados. Los mejores resultados de clasificación según los días de montanera se observaron para los espectros obtenidos de la grasa extraída cortando el espectro original en 2.000 nm (100% de aciertos en calibración) y en validación los mejores resultados correspondieron al registro en grasa intacta (83,3%). En cuanto a la clasificación de las muestras según la raza, también se observó un 100% de muestras correctamente clasificadas en calibración cuando el registro NIRS se realizó en la grasa extraída y un intervalo de 1.000-2.000nm. Sin embargo, los mejores resultados en predicción se obtuvieron cuando el registro se hizo sobre grasa intacta.

Ambas técnicas han mostrado ser eficientes para la clasificación de la materia prima del cerdo ibérico y podrían ser utilizadas en el mismo momento del sacrificio para la autenticación tanto de los días de montanera como de la raza. Si se comparan los resultados de ambas técnicas se puede apreciar que los porcentajes de correcta clasificación y predicción de las muestras son superiores en el caso de la tecnología GC-IMS. Por otro lado, la tecnología NIRS requiere menos tiempo de análisis y se puede aplicar en la grasa intacta lo que permitiría su implementación en línea clasificando las muestras "in situ".

Article

Authentication of the *Montanera* Period on Carcasses of Iberian Pigs by Using Analytical Techniques and Chemometric Analyses

Miriam Hernández-Jiménez ¹, Isabel Revilla ^{1,*}, Lourdes Arce ², María José Cardador ²,
Rocío Ríos-Reina ², Inmaculada González-Martín ³ and Ana María Vivar-Quintana ¹

- ¹ Food Technology, Universidad de Salamanca, E.P.S. de Zamora, Avda. Requejo 33, 49022 Zamora, Spain; miriamhj@usal.es (M.H.-J.); avivar@usal.es (A.M.V.-Q.)
- ² Department of Analytical Chemistry, Institute of Fine Chemistry and Nanochemistry, Marie Curie Annex Building, University of Córdoba, Campus de Rabanales, E-14071 Córdoba, Spain; qa1arjil@uco.es (L.A.); q22cadum@uco.es (M.J.C.); rrios5@us.es (R.R.-R.)
- ³ Analytical Chemistry, Nutrition and Bromatology, Universidad de Salamanca, C/Plaza de Los Caídos s/n, 37008 Salamanca, Spain; inmaglez@usal.es
- * Correspondence: irevilla@usal.es; Tel.: +34-677-53-49-73

Simple Summary: For the Iberian pork industry, the authentication of the raw material is of great importance. For this reason, the main object of this study was the classification of Iberian pig carcasses in accordance with the time the animals have spent in the *montanera* period and the breed. To do this, the potential of Near Infrared Spectroscopy and Gas Chromatography–Mass Spectrometry techniques was studied. Different sampling methods and mathematical treatments of the data were assayed. The results obtained show high percentages of correct classification both for days in the *montanera* and according to the breed for both techniques. The advantages for the industry are that none of the selected techniques require any chemical treatment of the sample before analysis and the proposed sampling is easy to use by the operator. It is also not necessary to identify individual compounds. This leads to the conclusion that both technologies are fast and useful for the authentication of raw material.

Abstract: The potential of two complementary analytical techniques (near infrared spectroscopy, NIRS and gas chromatography–ion mobility spectrometry, GC-IMS) was used to establish the time that Iberian pigs have been fed on acorns and pasture and to verify their genetic purity. For both techniques it was neither necessary to carry out any chemical treatment in advance nor to identify individual compounds. The results showed that both the NIR spectrum and the spectral fingerprint obtained by GC-IMS were affected by the time that the Iberian pig feeds on natural resources. High percentages of correct classification were achieved in the calibration for both techniques: >98% for the days of *montanera* and >96% for the breed by NIRS and >99% for the days of *montanera* and >98% for the breed by GC-IMS. The results obtained showed that NIR spectra taken from intact samples is a quick classification method according to the time of *montanera* and breed.

Keywords: NIRS; GC-IMS; Iberian pig carcasses; non-destructive sampling methods; acorns and grass feeding; acorn-fed



Citation: Hernández-Jiménez, M.; Revilla, I.; Arce, L.; Cardador, M.J.; Ríos-Reina, R.; González-Martín, I.; Vivar-Quintana, A.M. Authentication of the *Montanera* Period on Carcasses of Iberian Pigs by Using Analytical Techniques and Chemometric Analyses. *Animals* **2021**, *11*, 2671. <https://doi.org/10.3390/ani11092671>

Academic Editor:
Isabel Henning-Pauka

Received: 30 July 2021
Accepted: 8 September 2021
Published: 11 September 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Spain is the leading world producer of ham from white and Iberian pigs; the latter is a sector of huge importance to the Spanish economy [1]. There are four different categories on the market for products deriving from Iberian pigs which have been established in Royal Decree 4/2014 by the Spanish Ministry of Agriculture, Food, and the Environment, according to the breed, the production system, and the food given to the pigs during the last months of fattening prior to slaughter [2].

The traditional production system of the Iberian pig is based on the exploitation of the natural resources available in the dehesa ecosystem, in which the animal roams freely feeding on holm oak and/or cork oak acorns and pasture; this is known as *montanera*. According to this feeding system, a label of “100% Iberian acorn-fed” is awarded for the pure Iberian breed or one of “Iberian acorn-fed” when the purity of the breed is at least 50% Iberian (the mother is 100% Iberian and the father 50% Iberian or 100% Duroc). The *montanera* time is variable (it normally lasts from November to February) and depends on the resources available in each area. There is a positive and significant correlation between the *montanera* time and the oleic and linoleic fatty acids, which are mainly found in acorns [3,4]. It is for this reason that the *montanera* gives higher quality to products deriving from Iberian pigs and the latter fetch higher prices on the market. To prevent fraud in the labeling of these products it is, therefore, necessary to establish tools which allow the authentication of the breed and the feeding system of the Iberian pig when it is slaughtered.

The current official control method to certify the feeding regime of the animals is based on the visual inspection of the pigs on the farms by inspectors who work in accordance with the ISO/IEC 17020 standard [5]. As visual inspection is involved, this method may however be considered subjective. For this reason, research in this field has concentrated on the development of analytical methods which can be used to authenticate the feeding system of Iberian pigs. Most of these methods are based on the fatty acid profile of subcutaneous fat. The most frequently used techniques for obtaining the fatty acid profile have been Near Infrared (NIR) Spectroscopy [6–10] followed by Gas Chromatography (GC) combined with the flame ionization detector (FID) [3] or mass spectrometry (MS) [11]. The classification of pigs according to the type of feeding system has also been achieved by isotope analysis [12], electronic nose [13], or ultrasonic measurements [14]. The volatile organic compounds (VOCs) fingerprint has also been used with promising results in subcutaneous fat samples by using GC-MS [15] or UV-ion mobility spectrometry (UV-IMS) [16].

In this context, near infrared spectroscopy (NIRS) has turned out to be an efficient tool in the sector of the Iberian pig with different objectives. Some research studies have concentrated on the establishing of quantitative models to determine the lipid profile, which would replace the traditional analysis by GC [9,17–20]. Other studies have developed qualitative models with NIRS for the classification of carcasses of Iberian pigs according to their food [6,10,21–23] and breed [7]. However, NIRS has not yet been used to differentiate the days in *montanera*. NIR spectroscopy has the advantage of being a fast and economic technique which could be implemented in line at abattoirs or in quartering rooms as no prior preparation of the sample is required. This allows to obtain of a large amount of data in a few seconds so as to reveal a spectrum characteristic of each animal. However, owing to the number and the complexity of the data obtained from the NIR spectra, chemometric tools are needed for their interpretation.

Ion mobility spectrometry (IMS) is a fast and very sensitive technique which requires minimal or no sample preparation. This technique has also provided satisfactory results in the authentication of the feeding regime of the Iberian pig from subcutaneous fat [16] and in the classification of pieces of Iberian ham in accordance with the breed and the food given. Some studies have included a separation by GC prior to IMS [24,25]. The GC-IMS coupling combines the separation of the GC with the high sensitivity of the IMS, which allows the characterization of volatile compounds in the samples [24]. Analysis by GC-IMS provides complex data matrices which must be interpreted by using chemometric tools. With the aim of achieving rapid non-destructive sampling, Martín-Gómez et al. [25] recently proposed a methodology based on the puncturing of pieces of ham with sterile needles. These needles become impregnated with fat and their analysis by GC-IMS allows to obtain the volatile profile of the sample and the classification of the samples according to their breed and feeding system with very good results.

In this context, the main object of this study was to establish what is the best technique to achieve the classification of Iberian pig carcasses depending on the time the animals have

spent in *montanera* and the breed. To achieve this, subcutaneous fat obtained directly from the pig carcasses at the abattoir was used, which was subsequently taken to the laboratory in order to carry out the NIRS register with bench equipment and the GC-IMS analysis. Various sampling methods which are easy to implement in abattoirs were studied (cutting a block of subcutaneous fat and the insertion of needles at several temperatures) and compared with the usual methods of preparing samples (melting and homogenization). It was sought to establish whether the combined use of the data of both analytical techniques (NIRS and GC-IMS) is necessary to authenticate Iberian pigs or whether the use of a screening technique such as NIR is sufficient.

2. Materials and Methods

2.1. Sampling Procedure

Samples were taken from 105 carcasses under the regulations for Iberian pigs in accordance with Royal Decree 4/2014 [2], which implies the authenticity of the feeding regime and the breed. These carcasses were classified according to the time they had spent in *montanera* (fed on acorns and pasture). Of the total samples, 60 belonged to the “100% Iberian acorn-fed” category, of which 30 came from animals with 68 days of *montanera* (Group 1) and another 30 from animals with 84 days of *montanera* (Group 2). The remaining 45 samples belonged to the “Iberian acorn-fed” category, i.e., 50% Iberian animals which are Iberian × Duroc crossbreeds with 120 days of *montanera* (Group 3). These three groups were selected because they were fattened in the same geographical area (Badajoz, Spain) and in the same year; therefore, the type of feeding (holm oak and grass) was similar. The fatty acid composition of the acorns was as follows: fat content 8.56%, palmitic acid 15.08%, stearic acid 2.54%, oleic acid 63%, linoleic acid 17.46%.

Two different types of sampling were used: the cutting of a block of subcutaneous fat and the insertion of needles into subcutaneous fat (Figure 1).

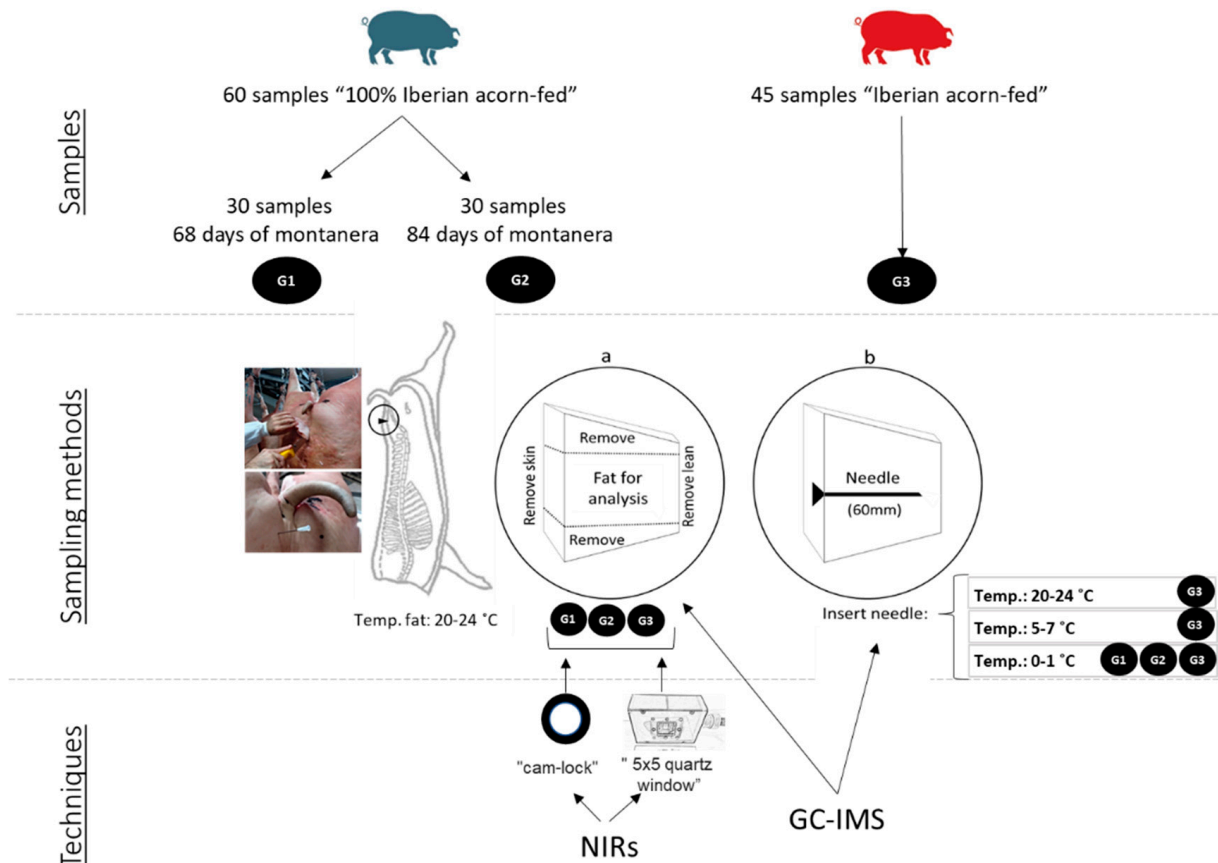


Figure 1. Sampling methods for subcutaneous fat: (a) standardized method; (b) samples taken with needles.

The first sampling type is standard in the sector and was carried out at the abattoir immediately after the slaughter. In this type of sampling, the carcasses remained hanging up and a cut was made in the skin as far as the lean meat in the subcutaneous fat of the coccyx, a few cm from the tail, taking all the fatty accumulations in depth (Figure 1a). The blocks of subcutaneous fat were identified and kept refrigerated in bags until their reception at the laboratory on the same day. This sampling was carried out on a total of 105 carcasses (groups 1, 2 and 3).

The second sampling was carried out at the same time as the standard sampling, without making cuts in the carcass, by means of inserting a sterile disposable needle of $2.1 \times 60 \text{ mm}^2$ (Bovivet-Kruuse, Langeskov, Denmark) into the same area of subcutaneous fat of the coccyx (Figure 1b). The aim was to impregnate the interior of the needle with the subcutaneous fat. The temperature of the fat at the time of the insertion in the abattoir was $22 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ (i.e., the first insertion). The metallic part of the needle was cut by using pliers and the needles were stored in glass vials of 20 mL closed with a metallic screw cap and a silicone septum. The vials were transported under refrigerated conditions until their reception at the laboratory and were subsequently stored at $-18 \text{ }^\circ\text{C}$ until their analysis. This type of sampling was carried out on a total of 45 carcasses (Group 3).

Moreover, in order to determine the optimum sampling temperature with the needle for the second sampling (Figure 1b), two further insertions were tested. Therefore, once in the laboratory, a second insertion was carried out with new needles inserted into the 45 samples of Group 3 with a temperature of $5\text{--}7 \text{ }^\circ\text{C}$ in the center of the piece; and a third insertion was carried out with new needles into the blocks of refrigerated subcutaneous fat at $0\text{--}1 \text{ }^\circ\text{C}$ for Group 1 (30 samples), Group 2 (30 samples), and Group 3 (45 samples). All the metallic parts were transferred to glass vials and stored at a temperature of $-18 \text{ }^\circ\text{C}$ until their analysis.

2.2. Sample Pretreatment

The blocks 10 cm long and 7 cm thick taking the full depth of the pork fat from the skin to the lean part (5–7 cm on average) of subcutaneous fat obtained at the slaughterhouse that had not been previously prepared were called “intact samples” (105 samples). The registration of NIR spectra using a fiber-optic probe was carried out directly on these samples.

After intact samples had been analyzed by Near Infrared Spectroscopy (NIRS), their skin and lean meat were removed from the subcutaneous fat and were homogenized by using IKA-ultra-turrax T25 basic equipment (IKA-Werke GmbH & Co. Kg, Staufen, Germany). These samples (105) were denominated “homogenized fat” and were kept at $-18 \text{ }^\circ\text{C}$ until analysis by Gas Chromatography Ion Mobility Spectroscopy (GC-IMS).

Three grams of homogenized fat were melted with microwaves at 1200 W using the defrosting position as previously reported by González et al. [26]. These samples (105) were denoted “extracted fat” and were analyzed by NIRS using the “cam-lock” capsules. In this case, 15 microliters of extracted fat heated at $30 \text{ }^\circ\text{C}$ were distributed in the surface of the cam-lock capsules.

2.3. GC-IMS Analysis

For the quality control of the GC-IMS instrument, a solution of butan-2-one, pentan-2-one, hexan-2-one, heptan-2-one, octan-2-one, and nonan-2-one at 0.5 mg L^{-1} was analyzed on a daily basis. Analytical standard grade reagents were purchased from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). A stock solution of 6 ketones at 1000 mg L^{-1} was prepared by dissolving the appropriate volume of each compound in Milli-Q ultrapure water and stored at $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Working solutions at 0.5 mg L^{-1} were prepared daily by diluting the stock solution with Milli-Q water.

The method used to analyze the samples was based on one previously reported for Iberian ham with minor modifications [25]. The homogenized subcutaneous fat and the samples taken with needles were analyzed by using a FlavourSpec[®] Static Headspace (SHS) GC-IMS instrument (Gesellschaft für Analytische Sensorsysteme mbH, G.A.S., Dortmund,

Germany). The device was equipped with an automatic sampler unit (Combi Pal, CTC Analytics AG, Zwingen, Switzerland) for 32 vials. The vial containing the sample (1 g of subcutaneous fat or a needle impregnated with fat) was therefore equilibrated for 20 min at 80 °C under constant shaking. Then, 100 µL of the headspace were sampled and automatically injected with a 2.5 mL Hamilton syringe (80 °C) into the heated splitless injector (80 °C). The chromatographic separation was performed at 50 °C using an HP-5MS (Agilent, Santa Clara, CA, USA) nonpolar column consisting of 5%-phenyl-methylpolysiloxane with a length of 30 m, an internal diameter of 0.32 mm, and a film thickness of 0.25 µm. Nitrogen with a purity of 5.0 (Abelló Linde, Barcelona, Spain) was used as a carrier gas (9 mL/min) and drift gas (150 mL/min). After the separation in the GC column, the compounds passed into the IMS detector and were ionized by the tritium 3H source (6.5 KeV). The drift tube (5 cm long) was operated at a constant voltage of 400 V cm⁻¹ and a temperature of 50°C. The spectra were acquired in positive mode with an average of 32 scans, a repetition rate of 21 ms, a grid pulse of 100 µs, and a sampling frequency of 150 KHz. IMS data were obtained using LAV[®] 2.1.1 software (Gesellschaft für Analytische Sensorsysteme mbH, G.A.S., Dortmund, Germany).

2.4. NIR Analysis

The spectra were registered using the Foss NIR System 5000 (Foss NIRSystems, Silver Spring, MD, USA) in two different ways. Firstly, the 1.5 m 210/210 remote reflectance bundle fiber-optic probe (Ref no. R6539-A) was applied directly to the 105 blocks of subcutaneous fat which had had no previous treatment (intact sample). The probe has a quartz register window of 5 cm × 5 cm with that it measures reflectance in the spectral range between 1100 and 2000 nm by using a ceramic plate as a reference. Secondly, “cam-lock” circular capsules with an optical path length of 0.1 nm were used, with 15 µL of melted liquid fat (extracted sample) deposited on them. The measurement was taken in reflectance mode between 1100 and 2498 nm. In both types of NIRS register, the spectra were recorded at 32 points of the sample a resolution of 2 nm, i.e., from the same sample, the device takes values at 32 points in the recording area of the cam-lock probe. To minimize sampling errors, the average of three spectra recorded in three aliquots of the sample was calculated. The spectra were presented as the logarithm of the inverse of the reflectance (R; log 1/R). The software used for data manipulation and chemometric analysis was WinISI 4.10.

2.5. Data Processing

2.5.1. Data Processing of GC-IMS

The data obtained by GC-IMS are represented in a topographic plot in which the drift time and retention time are set along the x-axis and y-axis, respectively. Signal intensity is indicated by color. As an example, Figure 2 shows the topographic plot obtained by analyzing the homogenized fat (A) and the needle (B) from a sample by GC-IMS. The compounds detected in the sample are represented by spots in the topographic plot. Moreover, one compound can result in more than one signal (monomer and dimer or even trimer) depending on their concentration [24].

2.5.2. Statistical Analysis of Data from GC-IMS

Classification models were created in order to classify the samples according to the breed (100% pure Iberian vs. 50% Iberian-Duroc crossbreeds) and to the *montanera* period (68, 84 and 120 days), using both homogenized subcutaneous fat and needles impregnated with fat. For this purpose, a chemometric treatment based on the use of the whole spectral fingerprint of the samples was applied since in a previous study [27] this approach had shown better classification and validation results than the use of specific markers. The peak alignment of samples was carried out as a previous pre-processing step using a reactant ion peak (RIP) as reference [27].

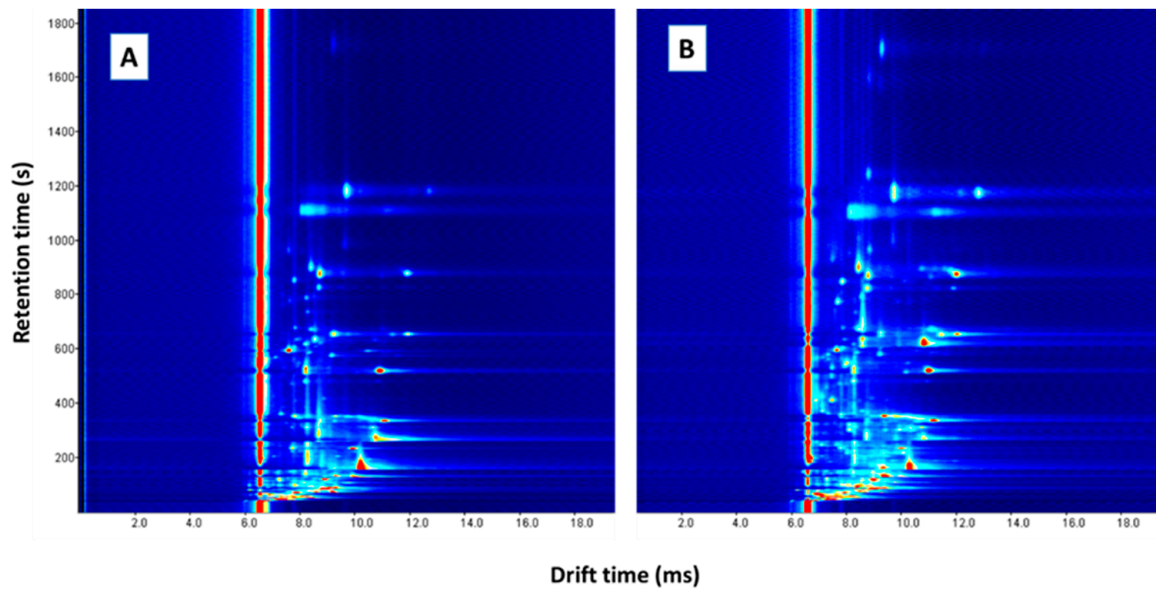


Figure 2. GC-IMS spectra from a sample sampled with: the homogenized fat (A); and with a needle (B).

Data pre-treatment consisted of the normalization of GC-IMS data using the RIP intensity value, a smoothing procedure based on Savitzky-Golay filtering, a baseline correction and data reduction, i.e., only the zone of each topographic plot which contains the majority of the data was used (between retention time from 41.580 to 1281.357 s and drift time from 6.806 to 13.326 ms). Then, the spectra selected for each sample were arranged consecutively in the same row of the matrix, and the resulting data matrix was pre-processed by mean centering prior to model building. Subsequently, a principal component analysis (PCA) followed by a linear discriminant analysis (LDA) were carried out. The non-supervised PCA analysis was carried out in the new arranged matrix (i.e., with concatenated spectra or each sample) in order to reduce dimensionality and extract the most relevant information, and then, LDA was applied to the PCA scores matrix of the selected principal components in order to incorporate class information into the model and to find directions to maximize class separability while aiming to minimize dispersion within each class. Finally, the k-nearest neighbor method (kNN), using $k = 3$, was applied to the matrix formed by the LDA scores of the selected canonical variables (CVs), as a simple methodology for sample classification, which finds the closest k samples of the dataset to the unknown sample and assigns the predominant class to it. This whole procedure was selected according to the satisfactory results obtained in previous studies [27,28]. Data were divided into a training set containing 80% of the samples of each category to build the calibration models and a validation set including the remaining 20%. This procedure was randomly performed 5 times in order to perform an internal validation, and then, the mean and the standard deviation of the models were calculated. All the GC-IMS data processing was performed by homemade routines written in the Matlab v.2016a (The Mathworks Inc., Natick, MA, USA) environment and the PLS_Toolbox 7.9.5 (Eigenvector Research Inc., Wenatchee, WA, USA).

2.5.3. Statistical Analysis of NIR Spectra

The discrimination method applied to the NIR data was the RMS-X residual method (Residual Mean Squares) by means of the WinIsi 4.10 software (Infrasoft International, State College, PA, USA). The RMS-X residual method is a supervised pattern recognition method, as membership of a certain group or class is known in advance. The RMS-X

method corroborates classes using residual data. The RMS(C) statistic is defined by the following formula [29].

$$\text{RMS(C)} = 10^6 \times \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_{ij} - y_{ik}) - \frac{(\sum_{i=1}^n (y_{ij} - y_{ik}))^2}{n}}{n - 1}}$$

in which y_{ij} is the log (1/R) of the subsample j for the wavelength i (λ_i), y_{ik} is the (log 1/R) of the subsample k for the wavelength i (λ_i), and n is the number of used wavelengths.

This measuring is useful to detect a spectral variation dissimilar to the spectral variation in the set of data of the products of reference [30].

The spectra had previously been subjected to the following spectral pre-treatments and are applied one by one and to each spectrum individually: Multiplicative Scatter Correction (MSC), Standard Normal Variate (SNV), Detrend Only (DT), or None to correct scattering phenomena. The aim pursued was thus to eliminate or reduce the effects which hinder the appropriate signal and to find the best discrimination between the samples [30,31]. The various mathematical treatments were encoded with 4 digits (a, b, c, d) [32] which mean: a (the order of the derivative), b (the number of points at which the derivative is carried out), c (the number of points at which the first smoothing is carried out), and d (the number of points at which the second smoothing is carried out). For example, the SNV (2,4,4,1) treatment combines the SNV scatter treatment with a second order derivative (the first digit in the parenthesis) carried out at four points (the second digit) together with a first smoothing carried out at four points (the third digit) and a second smoothing carried out at one point (the fourth digit). The application of derivatives is one of the most widely used pre-treatments in NIR spectroscopy because of its ability to overcome the characteristic problems of this technique: band overlap and baseline shifts. The first derivative eliminates constant baseline shifts and the second derivative eliminates shifts which vary linearly with wavelength.

3. Results and Discussion

3.1. GC-IMS Spectra of Iberian Fat Samples

3.1.1. Optimization of the Needle Sampling Method

Although a sampling method using needles has been proposed for cured ham which allowed its classification according to the feeding type and the breed with satisfactory results [25], this type of sampling for subcutaneous fat at the time of slaughter had not previously been used. For this reason, and in order to determine the methodology to follow with the carcasses, samples of Group 3 (the largest group, 45 pig carcasses) taken by four different protocols were analyzed. The sampling protocols were as follows: homogenized subcutaneous fat, needles inserted into subcutaneous fat at the abattoir at 20–24 °C, needles inserted into the block of cooled fat at 5–7 °C, and needles inserted into a block of refrigerated fat at 0–1 °C. The aim was to determine whether the type of sampling had a significant influence and to choose the most suitable procedure. A chemometric model was built by randomly splitting the dataset into 80% of the samples for classification and 20% of the samples for further external validation using the spectral fingerprint of Gas Chromatography Ion Mobility Spectroscopy (GC-IMS) as previously reported by Contreras et al. [27]. A Principal Component Analysis (PCA) model using 69 principal components (PCs) was built to explain 97% of total variance. With the PCA scores of those selected PCs, a Linear Discriminant Analysis (LDA) model was then built with two canonical variables (CVs), the scores of which are shown in Figure 3.

The results showed a clear separation between the samples of homogenized subcutaneous fat and the samples of fat taken with needles by the first canonical variables, being located in the right and the left part of it respectively (Figure 4). The different temperatures of the fat at the time of the sampling (0–1 °C, 5–7 °C, and 20–24 °C) also had a significant influence on the spectral footprint, in such a way that it is possible to distinguish three groups corresponding to the three ranges of temperature according to the second canonical

variable. The percentages of the classification and validation of the (kNN) model performed with these 2-CVs scores were $97.4 \pm 0.3\%$ and $87.1 \pm 7.1\%$ respectively. Moreover, it was observed that the subcutaneous fat samples were correctly classified in both calibration and validation sets in 100% of cases.

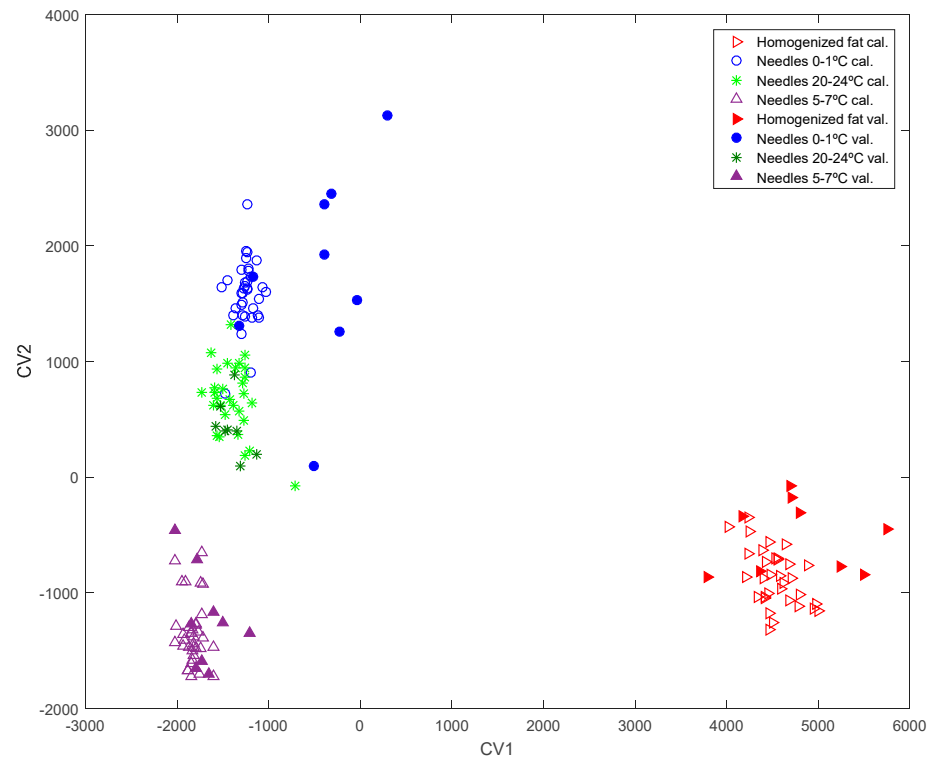


Figure 3. PCA-LDA model obtained from different groups of samples analyzed by GC-IMS: \circ Samples taken with needles at a temperature of 0–1 °C, \triangle Samples taken with needles at a temperature of 5–7 °C, $*$ Samples taken with needles at a temperature of 20–24 °C, \blacktriangleright homogenized fat. The same filled markers show validation samples.

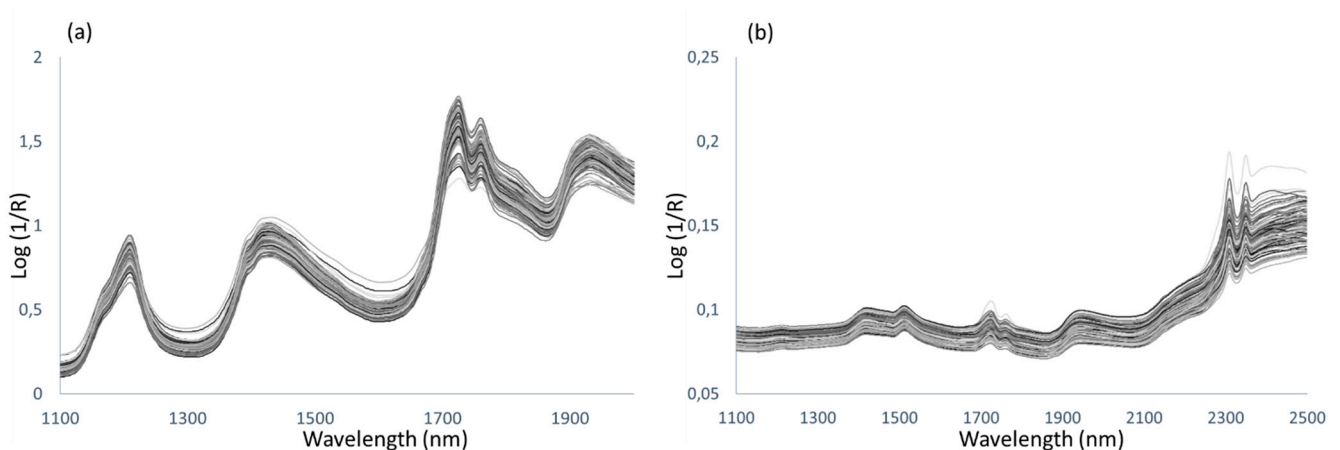


Figure 4. NIR spectra: (a) intact samples registered using fiber optic probe and (b) extracted samples registered using cam-lock capsules.

In light of the results which revealed the influence of the temperature and type of sampling (homogenized fat vs needle), it was established that the analyses by GC-IMS of the 105 samples of groups 1, 2 and 3 would be carried out both on homogenized fat and on needles inserted at 0–1 °C (Figure 1). This temperature was chosen for the needles

because fewer temperature variations between samples were observed (1 °C (0–1 °C), 2 °C (5–7 °C) and 4 °C (20–24 °C)) and the differences were statistically significant ($p < 0.05$). In addition, this temperature allows the collection of a larger amount of fat inside the needle, and the sampling of the fat throughout the depth of the piece, which makes it more representative. Moreover, the use of the needle at this temperature is the sampling procedure most easily adaptable to routine work in the transforming industry as the pieces are received refrigerated at a temperature of less than 3 °C.

3.1.2. Classification According to Days of *Montanera* and Genetic Purity

Subsequently, the viability of using the GC-IMS technique on fat samples to classify pig carcasses by breed and feeding system (days of *montanera*) was studied. For this purpose, 105 samples were taken (30 from Group 1, 30 from Group 2, and 45 from Group 3) by using the two sampling types selected: homogenized subcutaneous fat and fat taken with a needle at 0–1 °C. These groups were chosen because they were reared in the same geographical area, thus limiting the variability due to the intake of acorns with different composition and different types of pasture. These animals require a large area of land and therefore the number of different herds in the same location is limited. Since the aim was to establish the best methodology to differentiate between groups, the number and typology of the groups analyzed may be suitable to establish the most appropriate analysis technique and type of sampling. Once the protocol has been optimized, it could be used in future studies that include a balanced number of groups of both 100% Iberian and 50% Iberian pigs subjected to different days of *montanera*.

Table 1 shows the sample percentages correctly classified by PCA-LDA-kNN following the methodology previously described and using the spectral GC-IMS fingerprint obtained and pre-processed.

Table 1. Percentage of samples correctly classified (in bold) according to the days of *montanera* and breed using GC-IMS.

Sampling	Group (Ncal/Nval)	Samples Correctly Classified in Calibration (%)			Samples Correctly Classified in Prediction (%)		
		Group 1	Group 2	Group 3	Group 1	Group 2	Group 3
Homogenized fat	Group 1 (24/6)	97.8	0	2.2	66.7	11.1	22.2
	Group 2 (24/6)	0	100	0	8.3	83.4	8.3
	Group 3 (36/9)	0	0	100	8.3	8.3	83.4
Needle	Group 1 (24/6)	100	0	0	100	0	0
	Group 2 (24/6)	0	100	0	0	100	0
	Group 3 (36/9)	0	0	100	11.2	0	88.8
Sampling	Breed (Ncal/Nval)	Sampled Corrected Classified in Calibration (%)		Sampled Corrected Classified in Prediction (%)			
		100%	50%	100%	50%		
Homogenized fat	100% (48/12)	100	0	87.5	12.4		
	50% (36/9)	4.4	95.6	27.8	72.2		
Needle	100% (48/12)	97.7	2.3	91.6	8.4		
	50% (36/9)	0	100	5.5	94.5		

Ncal: number of samples in the calibration group. Nval: number of samples in the prediction group. Group 1: 68 days in *montanera*; group 2: 84 days in *montanera*; group 3: 120 days in *montanera*. 100%: 100% Iberian breed, 50%: Iberian × Duroc crossbreed.

The results of the classification of the samples of homogenized subcutaneous fat according to the days the animals have stayed in *montanera* (Groups 1, 2, and 3) suggest a separation between the three groups with success rates of around 99.4% in calibration and 78.6% in prediction. These classification results by days of *montanera* are similar, and even superior, to those reported by Alonso et al. [16] for the analysis of the subcutaneous fat of Iberian pigs fed on four diets with greater differences between them (free-range and with three types of commercial feed).

In the case of taking samples with needles inserted into subcutaneous fat, 100% of these samples are correctly classified in calibration and 95.2% in prediction, which are satisfactory results. The correct classification percentages depending on the feeding regime were superior to those obtained from cured ham [25] although it must be taken into account that in this work more variability factors were included. Thus, for subcutaneous fat differences in the feeding are directly reflected in the fat composition [33], while the dry-cured ham has also undergone changes owing to the curing process [34,35].

To study the classification capacity according to the breed, the samples were divided into 100% Iberian (60 samples) and 50% Iberian (45 samples). When the GC-IMS data on subcutaneous fat were used, the classification percentages obtained by PCA-LDA-kNN with the fingerprint were around 98.2% in calibration and 80.9% in prediction. In the case of sampling with needles, the classification percentages were 98.7% for calibration and around 92.9% for prediction (Table 1). These results showed that better classification results were achieved both to differentiate the *montanera* periods and the breed when sampling is carried out with needles.

3.2. Discrimination of Samples According to Days of *Montanera* and Breed by NIRS

The same 105 samples of subcutaneous fat (30 samples from Group 1, 30 samples from Group 2, and 45 samples from Group 3) were analyzed by Near Infrared Spectroscopy (NIRS) using: a) a remote reflectance optic-fiber NIR probe applied directly to the intact fat samples or b) cam-lock capsules in which a small amount of fat melted by means of microwaves (extracted fat) was placed. The NIR spectra obtained from the total of samples (105) by recording of the intact fat (optic-fiber probe) and the extracted fat (cam-lock capsules) are shown in Figure 4.

The two sets of spectra (intact fat and extracted fat) were treated independently by applying an RMS-X residual discriminant analysis after several mathematical pre-treatments were tested (Figure 5).

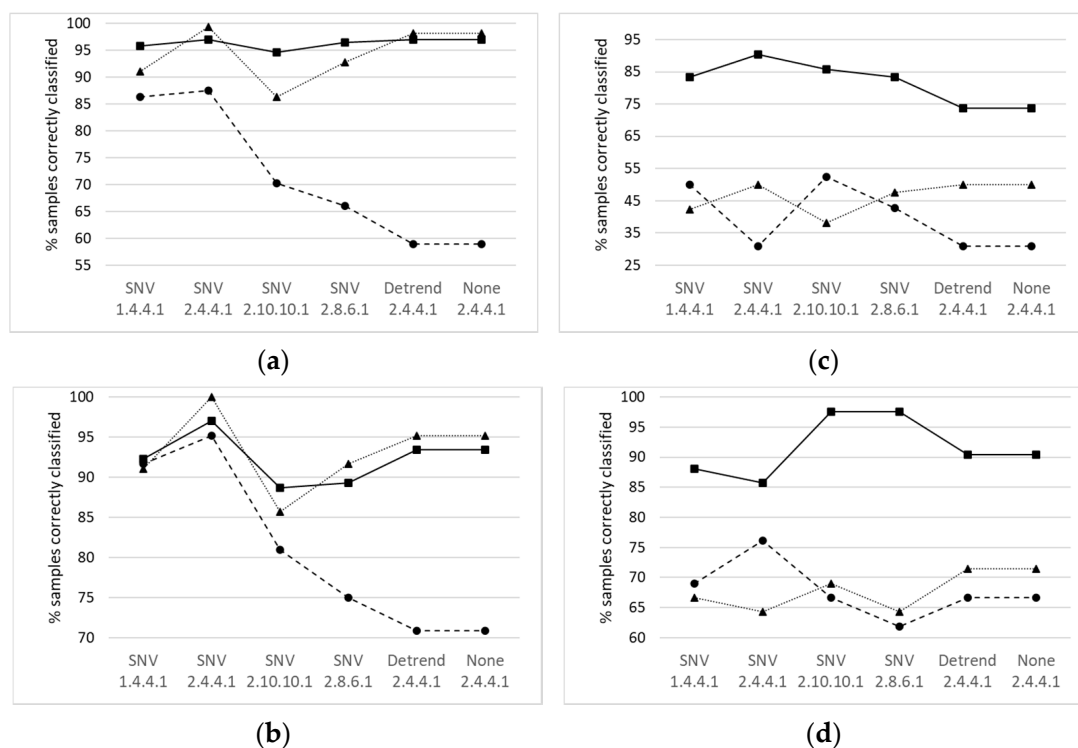


Figure 5. Percentage of samples correctly classified using different mathematical pre-treatments: (a) according to the days of *montanera* and (b) according to the breed. Percentage of samples correctly classified in prediction: (c) according to the days of *montanera* and (d) according to the breed. —■— Intact fat (1100–2000 nm),▲..... Extracted fat (1100–2000 nm) - -●- - Extracted fat (1100–2498 nm).

Figure 5 shows that the combination of SNV scatter treatment together with the (2,4,4,1) mathematical treatment gave the highest success rates for discrimination according to both factors studied (days of *montanera* and breed). The SNV (2,4,4,1) was also the most suitable pre-treatment for both intact fat and extracted fat and for the two different wavelength intervals considered. Although there were other mathematical treatments that gave better prediction results, the decrease in calibration success was very high and the increase in calibration success was low.

As previously mentioned, when the fiber optic was used the NIRS registered from 1100–2000.2 nm but when the cam-lock cells were used the NIRs registered from 1100 to 2498 nm. Results showed (Table 2) that when the classification was carried out on the interval given by the used probe, the percentage of correctly classified samples was higher in the case of the register with optic fiber than with the cam-lock cells (98.1% vs. 89.52% on average).

Table 2. Percentage of samples correctly classified (in bold) according to the days of *montanera* and breed by NIRS.

Sampling	NIR Registration	Wavelength Interval	Group (Ncal/Nval)	Samples Correctly Classified in Calibration (%)			Samples Correctly Classified in Prediction (%)		
				Group 1	Group 2	Group 3	Group 1	Group 2	Group 3
Intact fat	Optic fiber	1100–2000.2 nm	Group 1 (24/6)	100	0	0	91.7	0	8.3
			Group 2 (24/6)	4.2	89.5	6.3	8.3	75	16.7
			Group 3 (36/9)	0	2.8	97.2	16.7	0	83.3
Extracted fat	Cam-lock	1100–2498.2 nm	Group 1 (24/6)	70.8	8.3	20.9	16.7	25	58.3
			Group 2 (24/6)	0	93.7	6.3	0	33.3	66.7
			Group 3 (36/9)	0	5.6	94.4	5.5	0	94.5
Extracted fat	Cam-lock	1100–2000.2 nm	Group 1 (24/6)	97.9	0	2.1	33.3	25	41.7
			Group 2 (24/6)	0	100	0	8.3	25	66.7
			Group 3 (36/9)	0	0	100	5.6	16.7	77.7
Sampling	NIR Registration	Wavelength Interval	Breed (Ncal/Nval)	Samples Correctly Classified in Calibration (%)		Samples Correctly Classified in Prediction (%)			
				100%	50%	100%	50%		
Intact fat	Optic fiber	1100–2000.2 nm	100% (48/12)	94.8	5.2	79.2	20.8		
			50% (36/9)	0	100	5.6	94.4		
Extracted fat	Cam-lock	1100–2498.2 nm	100% (48/12)	93.8	6.2	75	25		
			50% (36/9)	2.8	97.2	22.2	77.8		
Extracted fat	Cam-lock	1100–2000.2 nm	100% (48/12)	100	0	79.2	20.8		
			50% (36/9)	0	100	55.6	44.4		

Ncal: number of samples in the calibration group. Nval: number of samples in the prediction group. Group 1: 68 days in *montanera*; group 2: 84 days in *montanera*; group 3: 120 days in *montanera*. 100%: 100% Iberian breed. 50%: Iberian × Duroc crossbreed.

Then the classification results of samples when using the whole spectra and when using only the 1100 and 2000.2 nm interval of the spectra obtained with cam-locks were compared. The best classification occurred when the wavelength interval was between 1100 and 2000.2 nm. The reason for these results is that the 1100–2000.2 nm interval of the NIR spectrum is where most of the absorption bands responsible for the differentiation of the Iberian pig are found. These bands correspond to the signals of the double bonds of the unsaturated fatty acids, as has been shown in previous studies on this type of samples [9]. Finally, the success rate in classification according to the days of *montanera* in the 1100–2000.2 nm interval was higher when the NIRS register was obtained from extracted fat (100%) than from intact fat, as previously reported in the literature [21]. This result is related to the fact that the differentiation is due to the composition of fatty acids. In intact fat the composition of the matrix is much more complex, which makes the determination of the fatty acids by NIR spectrometry more difficult.

However, the results of prediction by RMS-X residuals showed the opposite behavior. There, a higher success rate in classification was obtained for intact fat, with an average of 90.5% of samples correctly classified. It is noteworthy that a higher correct classification was observed for Group 1 followed by Group 3 both in calibration and validation. These are the groups that differed the most in the days of *montanera* and showed the higher variations in their fatty acid profile [33].

The percentage of samples correctly classified in prediction for extracted fat was significantly lower. Then only 50% of success for the 1100–2498.2 nm interval and 30.9% of success for the 1100–2000.2 nm interval were obtained. Therefore, the best results in prediction were again obtained when NIR spectra were recorded in the interval range of 1100–2000.2 nm. This result indicates out that the interval from 2000 to 2498.2 nm provides “noise” to the spectral information and lowers the percentage of correctly classified samples.

When the samples were classified according to breed, it was also observed (Table 3) that when the NIR spectrum was recorded from 1100 to 2000.2 nm in extracted fat samples using the cam-locks 100% correct classification was achieved. However, when the classification was carried out using the whole interval given by the probe used the best results were achieved using the optic-fiber probe on intact samples. Similar percentages have been reported by other authors in the discrimination of Iberian pig carcasses [6,7,10]. Regarding the results of samples correctly classified in prediction, the greatest success was obtained for intact fat, while extracted fat showed a lower percentage of correctly classified samples albeit higher than those observed for *montanera* days. In this case, the results for the 1100–2000 nm interval were slightly lower (65%) than the results for the 1100–2498.2 nm interval (76%). However, this result was observed only for the SNV (2,4,4,1) pre-treatment, while for the other pre-treatments the highest percentage of samples correctly classified was observed for the NIR spectra in the 1100–2000 nm interval (Figure 5).

Table 3. Comparison between the Gas Chromatography-Ion Mass Spectrometry (GC-IMS) and Near Infrared Spectrometry (NIRS) classification technologies.

	GC-IMS	NIRS
Fastest sampling procedure	needle	intact samples
Sampling time	15 s	1 min
Analysis	30 min	5 min
Classification by days of <i>montanera</i> (% of success in calibration)	100	98
Classification by days of <i>montanera</i> (% of success in prediction)	95.2	85.7
Classification by breed (% of success in calibration)	98.7	96
Classification by breed (% of success in prediction)	92.2	90.5

Therefore, although both types of NIR register (applying an optic-fiber probe to intact fat and using cam-locks on extracted fat in the interval of 1100 to 2000 nm) achieved high classification percentages in the calibration, the recording on intact fat showed the best results in prediction. In addition, the recording on intact fat methodology avoids the microwave extraction phase.

3.3. Comparison of the NIR and GC-IMS Results

The NIRS and GC-IMS analytical techniques for the classification of subcutaneous fat of Iberian pigs are both characterized by minimum preparation of the sample not involving organic solvents. These technologies are feasible and easy to use in companies by non-specialized workers. Table 3 compares the methods and classification results of the model obtained from the two techniques proposed (GC-IMS and NIRS) applied to the same samples of subcutaneous fat.

NIR technology was able to achieve satisfactory classification results (on average >98% for the days of *montanera* and >96% for the breed) by applying an optic-fiber probe directly without any type of sample preparation (intact samples). These percentages decrease slightly in prediction. In the case of the GC-IMS technique, the non-invasive sampling of fat by using needles gave higher classification percentages in calibration than those obtained by NIRS (100% for days of *montanera* and 98.7% for the breed) and although the

percentages in prediction were slightly lower (95 and 92.9% respectively) they were higher than for NIRS technology.

The recording of the NIR spectrum in intact samples of fat is a methodology which can be implemented in line. In fact, recent studies suggest that its application to subcutaneous fat gives good results in authentication [7]. However, the GC-IMS technique has the advantage of allowing not only the classification but also the identification of the volatile compounds responsible for the classification [25]. It therefore allows the obtaining of more information on the samples by means of the identification of compounds, which may indicate the time which the pig has spent in *montanera*. In this case, the use of needles may be a quick way of taking samples for their subsequent processing in the laboratory and could replace standard sampling in the sector as it also provides higher classification percentages for the factors considered.

4. Conclusions

The results showed that within the different sampling methods, the insertion of needles into subcutaneous fat blocks refrigerated at 0–1 °C is the simplest and fastest sampling technique for GC-IMS analytical methodology, giving the highest percentage of correctly authenticated samples in calibration (100% and 98.7%) and prediction (95.2% and 92.2% for days of *montanera* and breed, respectively). As for the NIRS technique, although the correct classification rate in calibration was 100% when the spectrum was obtained on extracted fat, NIR spectra recorded on intact samples showed good classification results in calibration (98% and 96% for days of *montanera* and breed, respectively) but better prediction capability without the need for sample preparation.

Both the analysis of the complete fingerprint obtained with GC-IMS and the spectra between 1100–2000 nm obtained with NIR spectroscopy are efficient in the classification of Iberian pig raw material and can be used for the authentication of the days of *montanera* or breed from the time of slaughter at the abattoir. Although NIRS showed slightly lower classification results than GC-IMS, it should be taken into account that NIRS has the advantages of requiring less time of analysis and easy sample preparation. Moreover, this is a fast and efficient method that could be implemented online.

Author Contributions: Conceptualization: L.A. and I.R.; methodology: I.G.-M., L.A. and I.R.; formal analysis: R.R.-R. and M.H.-J.; investigation: M.J.C. and M.H.-J.; writing—original draft preparation: M.J.C. and M.H.-J.; writing—review and editing: I.R., L.A., A.M.V.-Q. and R.R.-R.; supervision: I.R.; project administration: I.R. and A.M.V.-Q. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Salamanca County Council (Spain). Grant number 18VEUH 463AC06.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Acknowledgments: We are grateful to “Carrasco Ibéricos” Guijuelo (Salamanca) for the collaboration and Own Program III: Grants for Predoctoral Contracts of the University of Salamanca co-funded by Banco Santander.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Buxadé, C.; Daza, A. *Porcino Ibérico: Aspectos Claves*; Mundi-Prensa: Madrid, Spain, 2000.
2. Real Decreto 4/2014. de 10 de Enero. Por el Que se Aprueba la Norma de Calidad Para la Carne. el Jamón. la Paleta y la Caña de Lomo Ibérico. 2014. Available online: https://www.boe.es/diario_boe/txt.php?id=BOE-A-2014-318 (accessed on 9 September 2021).
3. Viera Alcaide, I.; Vicario, I.M.; Escudero Gilete, M.L.; Graciani Constante, E.; León Camacho, M. A Multivariate Study of the Triacylglycerols Composition of the Subcutaneous Adipose Tissue of Iberian Pig in Relation to the Fattening Diet and Genotype. *Grasas Aceites* **2008**, *59*, 327–336. [[CrossRef](#)]
4. Díaz, I.; García Regueiro, J.A.; Casillas, M.; De Pedro, E. Triglyceride Composition of Fresh Ham Fat from Iberian Pigs Produced with Different Systems of Animal Nutrition. *Food Chem.* **1996**, *55*, 383–387. [[CrossRef](#)]

5. ISO/IEC 17020 Conformity Assessment—Requirements for the Operation of Various Types of Bodies Performing Inspection. 2012. Available online: <https://www.iso.org/standard/52994.html> (accessed on 9 September 2021).
6. García-Olmo, J.; Garrido-Varo, A.; De Pedro, E. Classification of Real Farm Conditions Iberian Pigs According to the Feeding Regime with Multivariate Models Developed by Using Fatty Acids Composition or NIR Spectral Data. *Grasas Aceites* **2009**, *60*, 233–237. [[CrossRef](#)]
7. Horcada, A.; Valera, M.; Juárez, M.; Fernández-Cabanás, V.M. Authentication of Iberian Pork Official Quality Categories Using a Portable near Infrared Spectroscopy (NIRS) Instrument. *Food Chem.* **2020**, *318*, 126–133. [[CrossRef](#)]
8. De Pedro Sanz, E.; Serrano Crespín, A.; Zamora Rojas, E.; Garrido Varo, A.; Guerrero-Ginel, J.E.; Marín, D.P.; Casco, J.M.G.; Sánchez, M.N.N. Predicción del Índice de Reposición en Montanera para la clasificación de canales de cerdo ibérico según régimen alimenticio mediante el análisis no destructivo por Espectroscopía del Infrarrojo Cercano. *Sólo Cerdo Ibérico* **2013**, *30*, 87–100.
9. González-Martín, M.I.; Escuredo, O.; Hernández-Jiménez, M.; Revilla, I.; Vivar-Quintana, A.M.A.; Martínez-Martín, I.; Hernández-Ramos, P. Prediction of Stable Isotopes and Fatty Acids in Subcutaneous Fat of Iberian Pigs by Means of NIR: A Comparison between Benchtop and Portable Systems. *Talanta* **2021**, 121817. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Arce, L.; Domínguez-Vidal, A.; Rodríguez-Estévez, V.; López-Vidal, S.; Ayora-Cañada, M.J.; Valcárcel, M. Feasibility Study on the Use of Infrared Spectroscopy for the Direct Authentication of Iberian Pig Fattening Diet. *Anal. Chim. Acta* **2009**, *636*, 183–189. [[CrossRef](#)]
11. López-Vidal, S.; Rodríguez-Estévez, V.; Lago, S.; Arce, L.; Valcárcel, M. The Application of GC–MS and Chemometrics to Categorize the Feeding Regime of Iberian Pigs in Spain. *Chromatographia* **2008**, *68*, 593–601. [[CrossRef](#)]
12. González-Martín, I.; González-Pérez, C.; Hernández Méndez, J.; Marqués-Macias, E.; Sanz Poveda, F. Use of Isotope Analysis to Characterize Meat From Iberian-Breed Swine. *Meat Sci.* **1999**, *52*, 437–441. [[CrossRef](#)]
13. Santos, J.P.; García, M.; Aleixandre, M.; Horrillo, M.C.; Gutiérrez, J.; Sayago, I.; Fernández, M.J.; Arés, L. Electronic Nose for the Identification of Pig Feeding and Ripening Time in Iberian Hams. *Meat Sci.* **2004**, *66*, 727–732. [[CrossRef](#)]
14. Niñoles, L.; Sanjuan, N.; Ventanas, S.; Benedito, J. Ultrasonic and Sensory Characterization of Dry-Cured Ham Fat from Iberian Pigs with Different Genetics and Feeding Backgrounds. *Meat Sci.* **2008**, *80*, 896–902. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Narváez-Rivas, M.; Pablos, F.; Jurado, J.M.; León-Camacho, M. Authentication of Fattening Diet of Iberian Pigs According to Their Volatile Compounds Profile from Raw Subcutaneous Fat. *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, *399*, 2115–2122. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Alonso, R.; Rodríguez-Estévez, V.; Domínguez-Vidal, A.; Ayora-Cañada, M.J.; Arce, L.; Valcárcel, M. Ion Mobility Spectrometry of Volatile Compounds from Iberian Pig Fat for Fast Feeding Regime Authentication. *Talanta* **2008**, *76*, 591–596. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Fernández-Cabanás, V.M.; Garrido-Varo, A.; García Olmo, J.; Pedro, E.D.; Dardenne, P. Optimisation of the Spectral Pre-Treatments Used for Iberian Pig Fat NIR Calibrations. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **2007**, *87*, 104–112. [[CrossRef](#)]
18. De Pedro, E.; Garrido, A.; Bares, I.; Casillas, M.; Murray, I. Application of near Infrared Spectroscopy for Quality Control of Iberian Pork Industry. In *Near Infra-Red Spectroscopy. Bridging the Gap between Data Analysis and NIR Applications*; Hildrum, K.I., Isaksson, T., Naes, T., Tandberg, A., Eds.; Ellis Horwood: Chichester, UK, 1992; pp. 345–348.
19. González-Martín, I.; González-Pérez, C.; Hernández-Méndez, J.; Alvarez-García, N. Determination of Fatty Acids in the Subcutaneous Fat of Iberian Breed Swine by near Infrared Spectroscopy (NIRS) with a Fibre-Optic Probe. *Meat Sci.* **2003**, *65*, 713–719. [[CrossRef](#)]
20. Pérez-Marín, D.; De Pedro Sanz, E.; Guerrero-Ginel, J.E.; Garrido-Varo, A. A Feasibility Study on the Use of Near-Infrared Spectroscopy for Prediction of the Fatty Acid Profile in Live Iberian Pigs and Carcasses. *Meat Sci.* **2009**, *83*, 627–633. [[CrossRef](#)]
21. Zamora-Rojas, E.; Pérez-Marín, D.; De Pedro-Sanz, E.; Guerrero-Ginel, J.E.; Garrido-Varo, A. In-Situ Iberian Pig Carcass Classification Using a Micro-Electro-Mechanical System (MEMS)-Based near Infrared (NIR) Spectrometer. *Meat Sci.* **2012**, *90*, 636–642. [[CrossRef](#)]
22. Hervás, C.; Garrido, A.; Lucena, B.; García, N.; De Pedro, E. Near Infrared Spectroscopy for Classification of Iberian Pig Carcasses Using an Artificial Neural Network. *J. Near Infrared Spectrosc.* **1994**, *2*, 177–184. [[CrossRef](#)]
23. De Pedro, E.; Garrido, A.; Lobo, A.; Dardenne, P.; Murray, I. Objective Classification of Iberian Pig Carcasses: GC versus NIR. In *Leaping Ahead with Infrared Spectroscopy*; Batten, G.D., Flinn, P.C., Welsh, L.A., Blakeney, A.B., Eds.; Royal Australian Chemistry Institute: Melbourne, Australia, 1995; pp. 291–295.
24. Arroyo-Manzanares, N.; Martín-Gómez, A.; Jurado-Campos, N.; Garrido-Delgado, R.; Arce, C.; Arce, L. Target vs Spectral Fingerprint Data Analysis of Iberian Ham Samples for Avoiding Labelling Fraud Using Headspace-Gas Chromatography-Ion Mobility Spectrometry. *Food Chem.* **2018**, *246*, 65–73. [[CrossRef](#)]
25. Martín-Gómez, A.; Arroyo-Manzanares, N.; Rodríguez-Estévez, V.; Arce, L. Use of a Non-Destructive Sampling Method for Characterization of Iberian Cured Ham Breed and Feeding Regime Using GC-IMS. *Meat Sci.* **2019**, *152*, 146–154. [[CrossRef](#)]
26. González-Martín, I.; González-Pérez, C.; Hernández-Méndez, J.; Álvarez-García, N.; Merino Lázaro, S. Determination of Fatty Acids in the Subcutaneous Fat of Iberian Breed Swine by near Infrared Spectroscopy. A Comparative Study of the Methods for Obtaining Total Lipids: Solvents and Melting with Microwaves. *J. Infrared Spectrosc.* **2002**, *10*, 257–268. [[CrossRef](#)]
27. Contreras, M.M.; Jurado-Campos, N.; Arce, L.; Arroyo-Manzanares, N. A Robustness Study of Calibration Models for Olive Oil Classification: Targeted and Non-Targeted Fingerprint Approaches Based on GC-IMS. *Food Chem.* **2019**, *288*, 315–324. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

28. Gerhardt, N.; Schwolow, S.; Rohn, S.; Ruiz Pérez-Cacho, P.; Galán-Soldevilla, H.; Arce, L.; Weller, P. Quality Assessment of Olive Oils Based on Temperature-Ramped HS-GC-IMS and Sensory Evaluation: Comparison of Different Processing Approaches by LDA, kNN, and SVM. *Food Chem.* **2019**, *278*, 720–728. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Shenk, J.S.; Westerhaus, M.O. *Routine Operation, Calibration, Development and Network System Management Manual*; NIRSystems Inc.: Silver Spring, MD, USA, 1995.
30. Nørgaard, L.; Westerhaus, M.; Kjeldahl, K.; Haunstrup, I. Qualification: Adulteration Screening with NIR- a Case on Skim Milk Powder. *Focus* **2014**, *1*, 14–21. [[CrossRef](#)]
31. Norris, K.; Williams, P. Optimization of Mathematical Treatments of Raw Near-Infrared Signal in the Measurement of Protein in Hard Red Spring Wheat. Influence of Particle Size. *Cereal Chem.* **1984**, *61*, 158–165.
32. ISI. The Complete Software Solution Using a Single Screen for Routine Analysis, Robust Calibrations, and Networking. In *Manual FOSS NIRSystems*; Infrasoft International: Silver Spring, MD, USA, 2000.
33. Hernández-Jiménez, M.; González-Martín, M.I.; Martínez-Martín, I.; Revilla, I.; Vivar-Quintana, A.M. Carbon Stable Isotopes, Fatty Acids and the Use of NIRS to Differentiate IBERIAN Pigs. *Meat Sci.* **2021**, *182*, 108619. [[CrossRef](#)]
34. Narváez-Rivas, M.; Vicario, I.M.; Constante, E.G.; León-Camacho, M. Changes in the Fatty Acid and Triacylglycerol Profiles in the Subcutaneous Fat of Iberian Ham during the Dry-Curing Process. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 7131–7137. [[CrossRef](#)]
35. Narváez-Rivas, M.; Gallardo, E.; León-Camacho, M. Chemical Changes in Volatile Aldehydes and Ketones from Subcutaneous Fat during Ripening of Iberian Dry-Cured Ham. Prediction of the Curing Time. *Food Res. Int.* **2014**, *55*, 381–390. [[CrossRef](#)]

VI. CONCLUSIONES / CONCLUSIONS

CONCLUSIONES

La tecnología NIRS y el análisis GC-IMS han mostrado un gran potencial para clasificar las canales de cerdo ibérico mediante la generación de modelos en función de la raza y de la alimentación. Además, el poder predictivo de la tecnología NIRS presenta resultados óptimos para los perfiles de ácidos grasos de biopsias y de grasa subcutánea, así como para el valor de la relación de isótopos de carbono.

Conclusión del artículo 1.

La tecnología NIR ha presentado capacidad para la predicción de los valores de $\delta^{13}\text{C}$ (‰), de los porcentajes de los ácidos grasos mayoritarios y de otros minoritarios, así como del sumatorio de diferentes grupos de ácidos grasos. Además, el equipo portátil empleado ha proporcionado resultados predictivos aceptables en comparación con el equipo de sobremesa. Por lo tanto, los equipos portátiles pueden ser una alternativa para el control cuantitativo “in situ” de parámetros de interés del cerdo ibérico y la tecnología NIRS podría reemplazar los análisis químicos en el laboratorio.

Conclusión del artículo 2.

Los espectros NIR de grasa subcutánea (tomada en el momento previo a la entrada en montanera mediante biopsias y post-sacrificio en el momento del sacrificio) y el valor de $\delta^{13}\text{C}$ (‰) junto con el perfil lipídico y combinados con herramientas quimiométricas dan lugar a modelos clasificatorios con un 100% de éxito a la hora de discriminar en función del tipo de granja y el tipo de alimentación. Además, la espectroscopía NIRS tiene la capacidad de predecir el perfil lipídico y el $\delta^{13}\text{C}$ (‰) de la grasa. El poder predecir estos compuestos mediante una tecnología no invasiva, objetiva y rápida permite determinar y correlacionar $\delta^{13}\text{C}$ (‰) con la dieta durante la montanera, así como los ácidos grasos responsables de la producción de carne de calidad.

Conclusión del artículo 3.

Las tecnologías GC-IMS y NIRS han mostrado ser eficientes para la clasificación de la materia prima del cerdo ibérico tanto con el fin de autenticar los días de montanera como la raza. Los mejores porcentajes de clasificación y predicción correctas de las muestras son superiores en el caso de la tecnología GC-IMS. Sin embargo, la tecnología NIRS requiere menos tiempo de análisis y se puede aplicar en la grasa intacta, lo que permitiría su implementación en línea y la clasificación de muestras “in situ”.

CONCLUSIONS

NIRS technology and GC-IMS analysis have shown great potential for the classification of Iberian pig carcasses by generating statistical models according to the breed and the feeding system. In addition, the predictive capacity of NIRS technology showed optimal results for fatty acid profiles of biopsies and subcutaneous fat and also for the stable carbon isotope ratio value.

Conclusion to Article 1

The NIR technology showed prediction capability for $\delta^{13}\text{C}$ (‰) values, the percentage of major and minor fatty acids, and also the sum of the different fatty acid groups. In addition, the portable equipment tested gave acceptable prediction results compared with the benchtop equipment. Therefore, the portable equipment could be an alternative for the *in situ* quantitative control of the quality parameters of Iberian pork and NIRS technology could replace laboratory chemical analysis.

Conclusion to Article 2

The IR spectra of subcutaneous fat (taken both by biopsies immediately before the animals begin the *montanera* and at slaughter) and $\delta^{13}\text{C}$ (‰) values and lipid profiles together with chemometric tools provided 100% of the successful classification models for pig fat discrimination according to the livestock farm type and the feeding system. In addition, NIRS spectroscopy also has the ability to predict the lipid profile and $\delta^{13}\text{C}$ (‰) value of fat. Being able to predict these compounds by means of a non-invasive, objective, and rapid technique made it possible to determine and correlate $\delta^{13}\text{C}$ (‰) with the diet during the *montanera* period and also the fatty acids responsible for obtaining quality meat.

Conclusion to Article 3

GC-IMS and NIRS technologies have proven to be efficient for the classification of Iberian pork raw material both for authenticating the number of days on the *montanera* and the breed. The best classification and prediction percentages of the samples were higher for the GC-IMS technology. However, NIRS technology required less time for analysis and could be applied to intact fat, which allows its implementation on the slaughter line and in sample classification *in situ*.

