

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

MÁSTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA ALIMENTARIA

**“Desarrollo de estrategias para la evaluación
nutritiva de vegetación apetecible para
porcino de la raza Gochu Asturcelta en
monte bajo de castaño”**

**TRABAJO FIN DE MÁSTER
POR**

Rubén Prendes de la Cruz

Junio, 2019



Agradecimientos:

En primer lugar, mi agradecimiento al Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), Ministerio de Economía y Competitividad, que ha hecho posible la ejecución de este Trabajo Fin de Máster, gracias al soporte financiero del Proyecto de Investigación RTA2014-00051-04-01: Uso multifuncional del monte bajo de castaño en Asturias aplicando la tecnología NIRS como herramienta de ayuda., con la Cofinanciación del Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER).

Al Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (SERIDA) del Principado de Asturias, por permitir el desarrollo de este trabajo.

Quiero agradecer, además, a todas las personas que conforman el Área de Nutrición Pastos y Forrajes del SERIDA, con las que he trabajado y que me han prestado su ayuda para la realización de este trabajo. También a mi tutora y co-tutora por su ayuda indispensable para la consecución del estudio.

A los investigadores del SERIDA que trabajan en las instalaciones del CETEMAS, que han realizado los análisis de referencia de las muestras utilizadas durante el estudio. Así como a Marta Ciordia Ara por permitir la utilización de siete imágenes de su autoría para su inclusión en este trabajo.

También me gustaría dedicarles unas palabras de agradecimiento a mi familia, que siempre me han apoyado durante mis estudios, amigos y a mis abuelos que me enseñaron a amar la biología y la naturaleza.

Índice

Agradecimientos:.....	3
Lista de figuras:	6
Lista de Tablas:.....	8
Lista de abreviaturas:.....	9
Resumen:	11
Abstract:	12
1. Introducción:.....	13
1.1. Origen del cerdo como animal doméstico y evolución.....	13
1.2. Razas de cerdo en España	13
1.2.1 Tronco celta: características	14
1.3. Gochu Asturcelta:	16
1.3.1 Aprovechamiento de los recursos forestales por el ganado porcino del tronco celta: Gochu Asturcelta	17
1.4. Características de la canal cerdos tronco celta:.....	19
1.4.1. Características cárnicas y desarrollo del Gochu Asturcelta:	20
1.4.2. Ingesta de antioxidantes y efectos en la carne:	20
1.5 Tecnología NIRS:	22
1.5.1 Historia de NIRS	22
1.5.2 NIRS fundamentos:.....	23
1.5.3. Quimiometría	25
2. Objetivos:	26
3. Material y métodos:.....	26
3.1. Trabajo de campo:	27
3.2. Trabajo en laboratorio:.....	29
3.2.1. Análisis mediante NIRS: Construcción de librerías espectrales NIRS:	30
3.2.2. Análisis mediante técnicas de referencia:	32
3.3. Clasificación y análisis de los datos de referencia:.....	34
3.4. Desarrollo de calibraciones NIRS:	35
3.5. Tratamientos matemáticos:	37
3.5.1. Tratamiento SNV:	37
3.5.2. Tratamientos derivativos:.....	38
3.5.3. Tratamiento MSC:.....	40

3.6. Análisis cuantitativo de los datos:	41
3.7. Estadísticos de evaluación de las ecuaciones de calibración	42
4. Resultados:	43
4.1. Concentración de fenoles totales, taninos condensados y capacidad antioxidante en función de la especie vegetal	43
4.2 Tratamientos matemáticos aplicados a los datos espectrales:.....	51
5. Discusión:	61
5.1. Datos de referencia de FT, TC y CA y correlación con los datos predichos por NIRS	61
5.2. Variaciones en las medidas de referencia de FT, TC y CA en función del origen vegetal	65
6. Conclusiones:	68
7. Bibliografía:.....	69
7.2. Artículos científicos y libros:.....	69
7.2. Fuentes de imágenes y tablas:.....	78

Lista de figuras:

Fig. 1.1 Porco celta gallego_____	15
Fig. 1.2 Chato vitoriano_____	15
Fig. 1.3 Cerdo de Baztan_____	15
Fig. 1.4 Cerdo de Vic_____	15
Fig. 1.5 Gochu Asturcelta características morfológicas _____	16
Fig. 1.6 A la izquierda efecto del pastoreo y a la derecha regeneración posterior a una carga de 13,5 cerdos/ha _____	18
Fig. 1.7 Elementos fundamentales de la Tecnología NIRS _____	23
Fig. 1.8 Principales tipos de interacciones de la radiación NIR al incidir sobre las moléculas _____	24
Fig. 3.1 Imagen aérea de las parcelas donde se realizó el estudio indicando su área respectiva y los puntos de recogida de biomasa en las parcelas Control _____	28
Fig. 3.2 Muestreo de la vegetación: a la izquierda bosque, a la derecha. Prado en las parcelas control (C1, C2, C3), empleando 5 cuadrados/parcela de 2 x 2 m _____	29
Fig. 3.3 División de las muestras de vegetación en el laboratorio en materia muerta, fracción apetecible y fracción no apetecible. _____	29
Fig. 3.4 Medición de muestra de vegetación apetecible con equipo portátil MicroPhazir™ _____	30
Fig. 3.5 Vista lateral del equipo portátil MicroPhazir™ utilizado durante el estudio _____	31
Fig. 3.6 Espectro resultante de la medición en una muestra de vegetación apetecible para el Gochu Asturcelta _____	31
Fig. 3.7 Curvas de fluorescencia en función de la concentración de Trolox y del tiempo de exposición de la sonda de fluorescencia _____	34
Fig. 3.8 Espectros individuales de la población de vegetación apetecible _____	36
Fig. 3.9 Espectros de datos sometidos a tratamiento standard normal variate. _____	37
Fig. 3.10 Espectros de datos sometidos a tratamiento derivativo de primer orden_____	39
Fig. 3.11 Espectros de datos sometidos a tratamiento de segunda derivada Savitzki–Golay. _____	39

Fig. 3.12 Espectros de datos sometidos a tratamiento SNV combinado con un derivativo de primer orden. _____	39
Fig. 3.13 Espectros de datos sometidos a un tratamiento MSC combinado con una derivada primera Savitzki–Golay. _____	40
Fig. 4.1 Fenoles totales expresados como EAG/g _{ps} en muestras de suelo forestal, prado abierto y hojas de especies arbóreas _____	45
Fig. 4.2 Taninos condensados expresados como EC/g _{ps} en muestras de sotobosque, prado abierto y hojas de especies arbóreas _____	45
Fig. 4.3 Capacidad antioxidante expresada como μ moles Eq. Trolox/g _{ps} en muestras de suelo forestal, prado abierto y hojas de especies arbóreas _____	46
Fig. 4.4 Contenido de fenoles totales de los diferentes grupos vegetales _____	49
Fig. 4.5 Contenido en taninos condensados de las diferentes especies vegetales _____	50
Fig. 4.6 Capacidad antioxidante de los diferentes grupos de vegetales _____	51
Fig. 4.7 Espectro NIR promedio perteneciente a las muestras de vegetación apetecible previo a la aplicación de tratamientos matemáticas _____	52
Fig. 4.8 Espectro promedio de las muestras de vegetación apetecible tras aplicar un tratamiento matemático de standard normal variate (SNV) _____	52
Fig. 4.9 Promedio de los espectros tratados mediante standard normal variate en combinación con un derivativo de primer orden _____	53
Fig. 4.10 Espectro NIR promedio perteneciente a las muestras de vegetación apetecible tras aplicar un tratamiento matemático MSC combinado con una derivada de primer orden _____	54
Fig. 4.11 Espectro NIR promedio perteneciente a las muestras de vegetación apetecible siendo aplicada una derivada Savitzky-Golay de primer orden _____	54
Fig. 4.12 Espectro NIR promedio perteneciente a las muestras de vegetación apetecible tratando los espectros con una derivada segunda _____	55
Fig. 4.13 Espectro NIR promedio perteneciente a las muestras de vegetación apetecible tras aplicar un tratamiento de standard normal variate combinado con una derivada Savitzky-Golay de primer orden eliminando los doce valores pertenecientes a las longitudes de onda extremas _____	55
Fig. 4.14 Espectro promedio aplicando una derivada segunda eliminando los seis valores extremos a cada lado del rango de medida _____	56

Fig. 5.1 Estadísticos informativos de la precisión de la técnica de referencia y del error del método NIRS _____ 62

Lista de Tablas:

Tabla 4.1: Datos de referencia para fenoles totales, taninos condensados y capacidad antioxidante _____ 43

Tabla 4.2: Contenido promedio en FT, TC y CA de las diferentes fracciones vegetales. Con sus respectivas desviaciones típicas. _____ 48

Tabla 4.3 : Estadísticos de calibración y validación cruzada NIRS para la predicción de fenoles totales, según tratamiento matemático. _____ 57

Tabla 4.4 Estadísticos de calibración y validación cruzada NIRS para la predicción de taninos condensados, según tratamiento matemático. _____ 58

Tabla 4.5 : Estadísticos de calibración y validación cruzada NIRS para la predicción de capacidad antioxidante, según tratamiento matemático. _____ 59

Tabla 4.6 : Estadísticos de calibración y validación cruzada NIRS de los tratamientos seleccionados para la predicción de cada uno de los parámetros estudiados. _____ 60

Lista de abreviaturas:

1d: Tratamiento derivativo de primer orden

2d: Tratamiento derivativo de segundo orden

ACGA: Asociación de criadores de Gochu Asturcelta

CA: Capacidad antioxidante

CETEMAS: Centro Tecnológico de la Madera.

CIF Lourizan: Centro de Investigación Forestal de Lourizán.

EAG: Equivalentes de ácido gálico

EC: Equivalentes de catequina

ET: Equivalentes de Trolox

ETL: Error total de laboratorio

ETP: Error total de predicción

FT: Fenoles totales

g_{ps}: Gramos de peso seco

LEDs: Light emitting diode.

Log (1/R): Logaritmo de (1 / Reflectancia).

MIR: Radiación de infrarrojo medio

MS: Materia seca

MSC: Corrección del efecto multiplicativo

MSC1d,1,1: Tratamiento de corrección del efecto multiplicativo combinado con derivada de primer orden excluyendo un valor a cada lado del espectro

NA: Fracción de vegetación no apetecible

NEIKER Tecnalía: Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario

NIRS: Espectroscopia de reflectancia infrarrojo cercano

ORAC: Oxigen radical absorbance capacity (Capacidad de absorción de radicales oxígeno).

R²_c: Coeficiente de determinación de calibración.

R^2_v : Coeficiente de determinación de validación

SEC: Error estándar de calibración

SECV: Error estándar de validación cruzada

SERIDA: Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario

SNV: Standard Normal Variate (tipificación de la absorbancia)

SNV1d,1,1: Tratamiento SNV combinado con derivada de primer orden excluyendo un valor a cada lado del espectro

SNV1d,6,6: Tratamiento SNV combinado con derivada de primer orden excluyendo seis valores a cada lado del espectro.

TC: Taninos condensados

USC: Universidad de Santiago de Compostela

VAT: Fracción de vegetación apetecible total

VNA: Fracción de vegetación no apetecible

Resumen:

El Gochu Asturcelta es una raza de cerdo autóctona del Principado de Asturias. Al igual que otras variedades porcinas tradicionales de la Península Ibérica, en las últimas décadas se ha visto amenazada por la introducción de razas extranjeras que presentan una mayor proporción de materia magra y un desarrollo ontológico más acelerado. Con el objetivo de evitar la desaparición del Gochu Asturcelta, se funda en el año 2002, la asociación de criadores del Gochu Asturcelta (ACGA). En el año 2007 se reconoce oficialmente al Gochu Asturcelta en el Catálogo de Razas de Ganado Porcino de España. A pesar de haber aumentado su número en los últimos se han de buscar fórmulas que optimicen su cría y consumo.

En Asturias, el castaño es la especie arbórea que mayor superficie ocupa. El ecosistema forestal, además de producir madera, cumple muchas otras funciones, entre las que se encuentra el binomio frondosas-cerdo. Para el éxito de este sistema de producción en extensivo, además de la ingestión de frutos del bosque en otoño, hay que compensar su contenido limitante en proteína, mediante pastoreo de la flora vascular, la cual adicionalmente podría afectar a la calidad sensorial de las canales por su capacidad antioxidante.

Con el objetivo de aplicar tecnologías no destructivas con respuesta in-situ, este trabajo trata de desarrollar una estructura de bibliotecas espectrales de espectrometría de infrarrojo cercano (NIRS) de la flora vascular apetecible por el Gochu Asturcelta en el monte bajo de castaño de Asturias, que permita el desarrollo de modelos de predicción para determinar la composición en antioxidantes de manera inmediata y con un mínimo procesamiento de las muestras. Para ello, se realizaron diferentes tratamientos matemáticos que permiten determinar la concentración de polifenoles, taninos condensados y la capacidad antioxidante de la flora vascular apetecible por el Gochu Asturcelta presente en un monte de castaño atlántico mediante un equipo portátil de NIRS MicroPhazir™, ya que la presencia de estos compuestos antioxidantes podría mejorar la calidad de la carne y permitir un mayor grado de conservación durante el almacenamiento y transporte. Además, se mejorarían las expectativas comerciales del producto. Por otra parte, la presencia de Gochu Asturcelta en las zonas rurales de puede revitalizar demográfica y económicamente la región asturiana.

Abstract:

Gochu Asturcelta is an autochthone pig breed from Principado de Asturias. Like other traditional Iberian pig races, in the last few decades, it has been threatened by the introduction of foreign breeds that has a higher lean mass proportion and a faster growth development. Gochu Asturcelta Breeders Association (ACGA) was founded in 2002 to save this race from extinction. In 2007 it was officially recognized Gochu Asturcelta in the Porcine Cattle Breeds of Spain Catalog. Despite the increase of their number in the last years, it's necessary to find new points of view that optimize their growth and consume.

In Asturias, the chesnut tree is the one most extended. Apart from wood production, the forest releases much more functions like the leafy plants-pig association. To keep this association success in extensive production it's necessary to consume fruits on autumn, but also, an additional input of protein to make up for its low content in vascular plants. That fact could change the meat sensorial quality by its antioxidant properties.

With the aim of use non-destructive technologies, which can be used on site, this work tries to develop a structure of near-infrared spectrometry (NIRS) spectral libraries from desirable vascular plants for the Gochu Asturcelta which are present, the Atlantic chestnut forest in Asturias, that allows some mathematical prediction models development to determine quickly and with a minimal sample's manipulation their antioxidant composition. To achieve it, there were used some mathematical treatments, that enabled the measure of polyphenols, condensed tanins and antioxidant capacity from desirable vascular plants for the Gochu Asturcelta. It was used a near infrared spectroscopy equipment (MicroPhazirTM), the presence of this components could improve the meat quality and let a better conservation during storage and transport. Which would improve the commercial expectations of the product. On the other hand, the presence of Gochu Asturcelta in rural areas can demographically and economically revitalize the Asturian region.

1. Introducción:

1.1. Origen del cerdo como animal doméstico y evolución

El proceso de domesticación de los animales comienza en el neolítico y, lejos de lo que se podría pensar, es un proceso difuso en el que existe reproducción constante entre los individuos salvajes y los domésticos (Frantz et al., 2015). Existen ejemplos de domesticación involuntaria debido a las modificaciones ambientales llevadas a cabo por los humanos y otras voluntarias en las que la presión selectiva es más fuerte (Larson y Fuller, 2014; Frantz et al. et al., 2015). En el caso de *Sus scrofa* europeo se observan procesos homocigóticos previos a la domesticación que podrían deberse a la presencia de glaciares en la zona septentrional y central del continente (Wang et al., 2014). Sin embargo, los cruzamientos entre *Sus scrofa* salvaje y domestico no se interrumpen en ningún momento (evitando los cuellos de botella por aislamiento reproductivo). (Frantz et al., 2015).

1.2. Razas de cerdo en España

En cuanto a la Península Ibérica existen dos grupos de cerdos perfectamente diferenciados, las razas pertenecientes al tronco celta (situadas en la zona septentrional de España y Portugal) y el tronco Ibérico, ubicado al sur de la península (Aparicio, 1944). Aunque la distribución racial de estos troncos nunca ha estado delimitada por una línea excluyente, la literatura tradicional ha separado ambas poblaciones mediante una línea que, partiendo de la desembocadura del Miño, llegaba hasta Valencia, predominando al norte de la misma, los cerdos del tipo “céltico” y en la zona sur los del tipo “ibérico” (Buxadé, 1984).

Ambos troncos tienen un origen común en razas ancestrales del centro y norte de Europa. Sin embargo, las poblaciones ibéricas, se habrían asentado antes en la península, por lo que las razas celtas presentan un parecido mayor con los actuales cerdos centroeuropeos (Royo et al., 2008). Además, Royo y sus colaboradores (2008) apreciaron, gracias a un análisis de microsatélites nucleares un reciente cuello de botella entre las razas celta, a causa de las reducciones extremas en el número de individuos sufridas durante el siglo XX. Esto se debe principalmente, a la introducción de la raza Large White Yorkshire en territorio español, cuyo nivel de hipofunción hipofisaria es

muy elevado, logrando desarrollos muy precoces con gran acondroplastia y niveles de productividad muy superiores a las razas autóctonas (Aparicio, 1944), presentando, por otro lado, una mayor resistencia a la estabulación y a la producción intensiva (Argamentarías et al., 2012).

1.2.1 Tronco celta: características

Las razas del tronco celta tienen unas características similares a las de sus antecesores salvajes, siendo por tanto animales más rústicos. Por otro lado, se observa, que, tienen una funcionalidad más elevada de la hipófisis lo que genera a su vez una mayor actividad tiroidea en comparación con las variedades ibéricas. Así mismo, las razas celtas poseen una maduración más tardía que la de sus homólogos mediterráneos, debido a que el grado de domesticación y selección artificial de los últimos es mayor. Esto se debe a que poseen ciclos ontogénicos más cortos (Aparicio, 1944).

Principales razas
del tronco celta

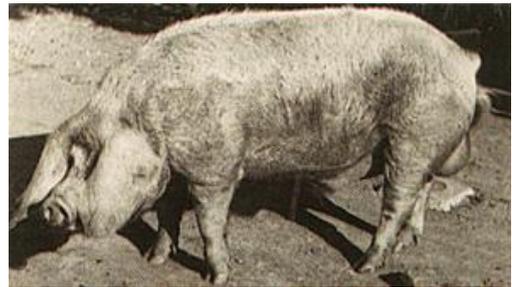
Porco Celta gallego



Chato vitoriano



Cerdo de Baztan



Cerdo de Vic

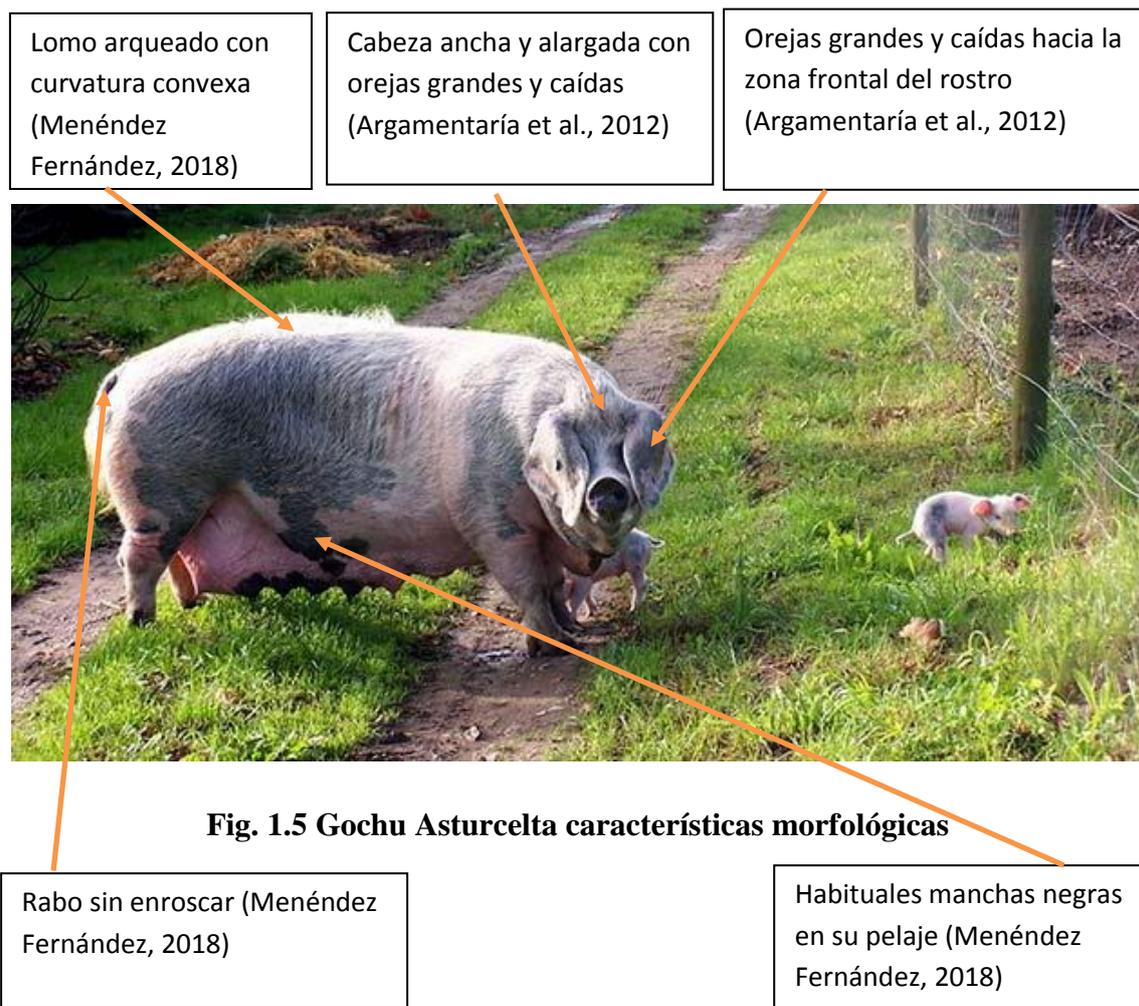


Gochu Asturcelta



1.3. Gochu Asturcelta:

Todas las características tanto ontogénicas, como morfológicas referentes a los cerdos del tronco celta son aplicables también al Gochu Asturcelta. Algunas de sus principales características morfológicas son: cabeza grande, tronco con el dorso combado hacia arriba y vientre recogido, con pesos de 180-230 Kg en hembras adultas y 230-280 Kg para los machos (Menéndez Fernández, 2018).



En el año 2002 se funda la Asociación de Criadores de Gochu Asturcelta (ACGA) que, en primera instancia tenía como finalidad localizar y reunir en un único punto a los cerdos de la raza Asturcelta, ya que por aquel entonces no existía ningún censo y los pocos individuos supervivientes se encontraban muy distribuidos por el territorio. En el año 2005 se estableció un convenio de colaboración entre, la Consejería de Medio Rural y Pesca del Principado de Asturias, SERIDA y ACGA, recayendo sobre esta última, la responsabilidad de recuperar e incrementar el número de individuos de la raza Asturcelta estableciéndose como Núcleo de Multiplicación del Gochu Asturcelta las

instalaciones del Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (SERIDA) en Villaviciosa (Menéndez Fernández, 2018). Dos años más tarde, gracias a los esfuerzos realizados por ACGA, SERIDA y a la mayor implicación del gobierno asturiano se logró el Reconocimiento oficial de la raza “Gochu Asturcelta”, así como su inclusión en el Catálogo de Razas de Ganado de España que fue publicado en el BOE nº. 21 de 24 de enero de 2007. En el mismo año tuvo lugar la creación del libro genealógico de la raza, cuyo contenido está regulado por la Resolución del 13 de abril de 2007 (Menéndez Fernández, 2018). Entre otras funciones en este libro se asigna una “calificación morfológica” a cada individuo en base a determinadas características (arqueamiento lumbar, coloración etc.), permitiendo, por un lado, el incremento de individuos y promoviendo, a su vez la pureza de la raza. Así mismo, como se citó anteriormente, se designaron las instalaciones del Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario como el centro neurálgico de la recuperación. (Argamentaría et al., 2012).

En los últimos años el número de cabezas de Gochu Asturcelta se ha incrementado de 242 en 2007 a 1711 individuos en 2011. A pesar de este éxito inicial, el futuro de las razas autóctonas se encuentra íntimamente ligado al aprovechamiento productivo que se les dé, así como la capacidad de venta que tengan los ganaderos en referencia a estos productos (Argamentaría et al., 2012).

1.3.1 Aprovechamiento de los recursos forestales por el ganado porcino del tronco celta: Gochu Asturcelta

Desde hace milenios, el norte de España ha estado dominado por formaciones boscosas que incluían un elevado número de especies arbóreas, bajo el que crecía un estrato arbustivo-subarbustivo (matorral), un estrato herbáceo y un estrato muscinal. En Asturias, el castaño es la especie arbórea que mayor superficie ocupa: 80.560 hectáreas como especie principal, a las que se suman casi otras 100.000 en la que es acompañante de otras frondosas. En la actualidad predomina el monte bajo o medio si está en mezcla con otras especies (Arias Fernández, 2015).

El ecosistema forestal, además de producir madera, cumple muchas otras funciones, como regular el ciclo hidrológico, fijar el CO₂ atmosférico o permitir que sobrevivan las especies asociadas a cada hábitat, sin olvidar su uso recreativo o su valor estético o

cultural, así como la producción de plantas aromáticas y medicinales, setas, obtención de polifenoles, aprovechamiento cinegético, entre otros. La explotación del monte debe, pues, ser multifuncional, combinando actividades complementarias (Mac Dicken et al., 2015).

El sistema agroforestal, frondosas-cerdo, facilita la gestión de ecosistemas de gran valor ecológico y ambiental, una buena adaptación a las directrices europeas del agua, siendo una actividad viable y sostenible, capaz de mantener la importante diversidad de razas de ganado y una forma de manejar el ganado en un mayor grado de bienestar, permitiendo a los animales gozar de una situación de semilibertad al aire libre. También presenta una notable capacidad de reversibilidad en caso de excesiva presión sobre el medio (De la Roza Delgado et al., 2017).

Los ejemplares de porcino de la raza Asturcelta, son capaces de transitar por terrenos con fuertes pendientes, siguiendo las curvas de nivel. Su comportamiento instintivo les impulsa al hozadom mediante el que extraen raíces, tubérculos y una pequeña parte de proteína animal. Distinguen bien las plantas tóxicas, probablemente gracias a un elevado sentido del olfato, e, ingieren un elevado número de taxones del estrato arbustivo-subarbustivo. Rechazan especies duras, coriáceas y espinosas, pero son capaces de aprovechar brotes tiernos de tojo y de brezo. En lo que respecta al estrato herbáceo, rechazan las gramíneas con elevada proporción de tallo, pero aceptan gran cantidad de pratenses en general. Según ensayos realizados en el SERIDA, incluso con una carga de 13,5 cerdos/ha, la superficie de prado fue capaz de rebrotar a lo largo de la primavera con una carga de 2,5 cerdos/ha no se mostraron daños por pisoteo y rebrotó a lo largo del otoño (**Fig. 1.6**) (De la Roza Delgado et al., 2017).



Fig. 1.6 A la izquierda efecto del pastoreo y a la derecha regeneración posterior a una carga de 13,5 cerdos/ha. (Imagen cedida por Ciordia Ara, M.)

Para el éxito de este sistema de producción en extensivo, se precisan otras dos condiciones adicionales. La primera, es que la ingestión de frutos del bosque en otoño debe permitir aproximarse a los 150 kg de peso vivo a los 13 meses de edad. De lo contrario, el nivel de infiltración de grasa intramuscular puede resultar insuficiente y afectar negativamente a la valoración sensorial de la carne. Implica que debe prestarse especial cuidado a la carga ganadera. Si es excesiva, además de la limitación de ingestión, puede ocasionar efectos medioambientales negativos (De la Roza Delgado et al, 2017).

La segunda, es que es preciso compensar el contenido limitante en proteína de los frutos del bosque. Un déficit proteico no sólo disminuye el contenido en proteína de la carne, si no, que también aumenta el engrasamiento de la canal, depreciándola. Podemos acudir a suplementación con pienso de recría, pero resulta preferible con hierba de otoño, más económica y disponible en ecosistemas forestales del monte bajo de castaño en Asturias. En síntesis, el distintivo de calidad diferenciada de carne de Gochu Asturcelta frente a la de cerdos blancos de producción intensiva, debe ser un color más rojizo, más brillo, mejor jaspeado y mayor proporción de insaturados, unido a mejores cualidades organolépticas (De la Roza Delgado et al., 2017).

1.4. Características de la canal cerdos tronco celta:

A nivel comercial la unidad de transacción entre los sectores de producción y distribución cárnicos es la canal, que podríamos definir como el cuerpo del cerdo u otro animal sacrificado. En el caso del cerdo, se divide en dos partes simétricas, tras el sangrado y la retirada de las partes no consumibles por los seres humanos. Se realiza una clasificación de las canales para asignarles un valor económico equitativo. Existen métodos predictivos para analizar la calidad de la canal en razas autóctonas, ya que las medidas están estandarizadas para razas globales. El método más eficaz para analizar la composición es la disección. También resulta muy útil, medir el espesor de la grasa subcutánea, siendo esto último, más sencillo (Lorenzo Rodríguez et al., 2012). En cuanto al rendimiento de la canal es similar en razas del tronco mediterráneo (75%-80%). Sánchez, y sus colaboradores de la Universidad de Córdoba realizaron estudios en el año 2000 analizando la composición de la canal de cerdos celtas en comparación otras razas cosmopolitas europeas y americanas. Se aprecia un reducido porcentaje de contenido magro y jamón en los cerdos del tronco celta, sin embargo, presentan una

gran cantidad de tocino graso y mayor porcentaje de cabeza por canal, siempre en comparación con razas foráneas como el cerdo blanco de Yorkshire citado con anterioridad. Estas características hacen que la canal de los cerdos del tronco celta no sea tan apreciada para la venta al gran público, por su alto contenido en grasa.

1.4.1. Características cárnicas y desarrollo del Gochu Asturcelta:

Al igual que las demás razas porcinas autóctonas, pertenecientes al tronco celta, descritas con anterioridad, el Gochu Asturcelta es un animal de perfil lipogénico. Ya que, a partir del año de edad, la capacidad de síntesis de proteína tisular es muy baja y el aumento de peso equivale casi exclusivamente a deposición de grasa. De ahí que el pienso de acabado que se emplea en producción semiextensiva tenga muy bajo contenido proteico con el objetivo de optimizar el desarrollo. Se utiliza asiduamente una mezcla de cebada y centeno con adición de lisina y treonina sintéticas para corregir el déficit de los cereales en dichos aminoácidos esenciales (De la Roza Delgado et al., 2018). Para el Gochu Asturcelta, el espesor de tocino dorsal es excesivo y el contenido en grasa intramuscular de la carne muy elevado, en animales sacrificados a partir de 15 meses de edad. Por este motivo los expertos recomiendan sacrificio a un máximo de 13 meses de edad. En ese momento, el animal puede alcanzar 150-160 kg de peso vivo (De la Roza Delgado et al., 2018). El rendimiento canal se aproxima al 80%, lo que supone un valor similar al registrado para otras razas del tronco mediterráneo (Sánchez et al., 2000) y la carne presenta una buena infiltración de grasa (jaspeado), caracterizada por un elevado contenido en ácidos grasos poliinsaturados (Vieira et al., 2012).

1.4.2. Ingesta de antioxidantes y efectos en la carne:

Las bellotas de roble carballo (*Quercus robur*) y las castañas poseen una elevada proporción de ácidos grasos poliinsaturados linoleico y linolénico, que transmiten buen sabor a la carne, pero su bajo punto de fusión reblandece la grasa, lo cual, obliga a tomar precauciones en la elaboración de productos cárnicos. Estos ácidos grasos también provocan que la grasa resulte más sensible a la oxidación, por lo cual es deseable la ingestión de antioxidantes naturales del ecosistema forestal para evitar estos inconvenientes, entre estos, destacan principalmente los polifenoles (De la Roza Delgado et al., 2018).

En los últimos años se ha popularizado el estudio de las sustancias activas presentes en los alimentos de los animales pudiendo mejorar la calidad de los productos animales (Pieszka, et al., 2017). Existen investigaciones que demuestran la relación entre una mayor ingesta de antioxidantes y un incremento en la estabilidad de los lípidos en la carne, lográndose un mantenimiento del color durante más tiempo (Pogorzelska Nowicka, 2018). Los antioxidantes se definen como sustancias químicas que permiten retrasar significativamente o impedir la oxidación de otros compuestos (Díaz et al., 2013). Debido a la gran cantidad de ácidos grasos monoinsaturados que posee, la carne del cerdo es particularmente sensible a la oxidación. Sin embargo, se ha demostrado que un incremento de antioxidantes en la ingesta permite disminuir el grado de oxidación en la carne (Jasinska y Kurek, 2017), lo que permite una mejor conservación durante el almacenado y el transporte. Los taninos presentes en la alimentación del ganado ovino, bobino o porcino tienen, por un lado, un efecto inhibitor de la actividad ruminal (Lobón et al., 2018), disminuyendo la ingesta voluntaria y ralentizando el proceso de engorde del animal. Sin embargo, se ha comprobado que estos compuestos poseen la capacidad de unirse a las proteínas ingeridas por el animal durante la digestión y tras el paso al tracto intestinal, ejerciendo una función protectora y permitiendo una mayor absorción proteica en el intestino posterior (Lobón et al., 2018).

Como hemos descrito con anterioridad, la presencia y cantidad de ciertos compuestos en los alimentos que consumen los animales, tiene gran relevancia en las características de la carne. Así pues, el conocimiento preciso de los alimentos ingeridos por el ganado cobra una importancia fundamental. Especialmente desde hace unos 25 años uno de los métodos de referencia para analizar la composición química de los alimentos es la espectroscopia de infrarrojo cercano (NIRS) (Bittner et al., 2013)

La creciente demanda de calidad en la industria alimentaria hace que los métodos tradicionales para el análisis de alimentos sean demasiado costosos y lentos. La tecnología NIRS permite el control rápido y exhaustivo de las mediciones, aunque requiere de cálculos matemáticos para su interpretación (análisis quimiométricos) (Porep et al., 2015). Dos características muy positivas de la tecnología NIRS son: que no implica destrucción del alimento estudiado (si la muestra analizada es entera puede germinarse después) y una vez finalizado el proceso de calibración no requiere el uso de productos químicos (Landau et al., 2005), por el contrario, su principal desventaja es,

que requiere de técnicas de medición externas que contrasten los resultados obtenidos (Siesler et al., 2008).

1.5 Tecnología NIRS:

1.5.1 Historia de NIRS

El descubrimiento de la radiación de infrarrojo cercano lo llevó a cabo Herschel en 1800, cuando realizaba un ensayo para filtrar calor a través de un telescopio (Herschel, 1800). Durante muchos años el infrarrojo cercano (NIR), fue visto como una longitud de onda lateral, sin demasiado interés en relación con el espectro visible o el infrarrojo medio (MIR). Las principales razones por la que la tecnología NIRS sustituyó a otras similares como MIRS y a la espectroscopia de Raman son: su capacidad para estudiar las muestras en formas más sencillas, sin que requieran apenas preparación previa y, por otro lado, la posibilidad de separar las posiciones de medida de las muestras (Pasquini, 2003).

En la segunda mitad del siglo XX fueron ampliándose las capacidades instrumentales para desarrollar la técnica. Desde los años 50 se le dio usos al NIRS para realizar análisis químicos en el campo de la agricultura. En la década de los años 1980s se comenzó a desarrollar el instrumental necesario (lentes de fibra óptica) para aplicar la técnica, pero hasta la década de los 90 no se desarrollaron modelos quimiométricos aceptados (Porep et al., 2015) El interés de las empresas en esta tecnología favoreció la transición desde equipos voluminosos y estáticos a dispositivos más ligeros y prácticos que permitieron la portabilidad y el análisis in situ en los procesos industriales, muestreos en el campo etc. Estos dispositivos supusieron una revolución en el sector debido al gran ahorro en gasto energético, agilidad en los análisis, mayor comodidad (Santos et al., 2013).

La tecnología de infrarrojo cercano, hoy en día, tiene aplicaciones a escala de laboratorio, pero también a escala industrial permitiendo una mayor eficiencia y sostenibilidad en la producción alimentaria permitiendo un control exhaustivo y a tiempo real de todo el procesado (Grassi y Alamprese, 2018).

1.5.2 NIRS fundamentos:

La espectroscopia del infrarrojo cercano emplea energía fotónica en un rango de 750 a 2500 nm (Pasquini, 2003), siendo la región del infrarrojo la más cercana a la longitud de onda visible (Groenewald, 2006). Básicamente un espectrofotómetro de infrarrojo cercano consta de una fuente de radiación, un monocromador que permite seleccionar la longitud de onda requerida en cada caso, un lugar para la colocación de la muestra a analizar que posibilite la incidencia de la radiación y un detector óptico que transforme la radiación que le llegue en energía eléctrica. Por último, requiere de un sistema informático para el procesado de datos (Patel et al., 2016).

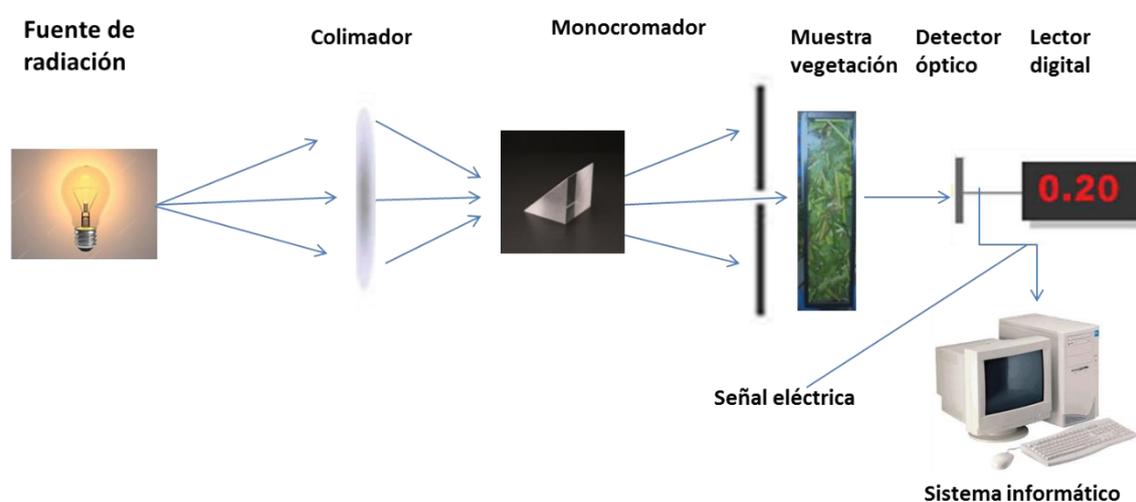


Fig. 1.7 Elementos fundamentales de la Tecnología NIRS

Respecto al primer elemento, se pueden emplear fuentes de radiación térmicas consistentes en un filamento radiante (tungstenio - halógeno, cuarzo etc.) o no térmicas, que son más eficaces ya que concentran la energía emitida en un rango mucho más estrecho de longitudes de onda (más energía emitida en el NIR), algunos ejemplos son los diodos laser o los LEDs etc. (Manley y Baeten, 2018). Además, para obtener información de la muestra es fundamental que la radiación suministrada penetre en ella, esto se consigue con longitudes de onda muy energéticas como las de la región NIR, que son seleccionadas en cada caso gracias al monocromador.

Según exponen, Siesler y sus colaboradores en su trabajo publicado el año 2008, pueden existir múltiples tipos de interacciones al incidir la radiación sobre la muestra:

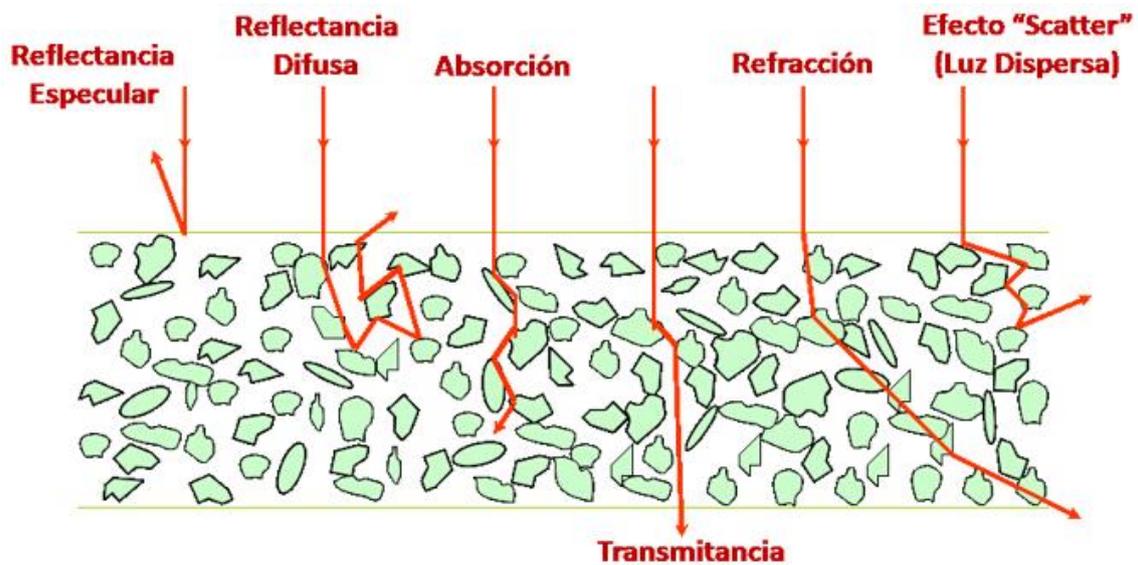


Fig. 1.8 (Adaptación de Shenk et al., 1992) Principales tipos de interacciones de la radiación NIR al incidir sobre las moléculas.

-Absorción molecular: Ocurre al incidir radiación de longitudes de onda comprendidas entre los 750-2500 nm sobre determinados compuestos químicos. En muestras biológicas absorben a esta longitud de onda los enlaces atómicos: C-H, N-H, O-H y S-H. El agua también absorbe en NIR, por sus enlaces O-H (Porep et al., 2015). Esta absorción de energía permite la promoción de los electrones a niveles energéticos superiores.

-Radiación reflejada en superficie o reflectancia especular: No penetra en la muestra, por lo que no interactúa con ella, de esta forma, no aporta información válida.

-Reflectancia difusa: En este caso la radiación penetra en la muestra, pudiendo ser absorbida por determinados enlaces moleculares tal y como se explica en el caso anterior. Sin embargo, posteriormente la energía puede ser emitida volviendo los electrones a su estado energético original. A este fenómeno se lo conoce como reflectancia difusa de la radiación (Alomar y Fuchslocher, 1998) A diferencia de la anterior, nos aporta información relevante acerca de la composición muestral.

-Transmitancia: La radiación atraviesa la muestra saliendo por el lado opuesto, aporta información relevante.

-Refracción: Similar a la transmitancia. En este caso, sin embargo, existe una desviación en la trayectoria de la radiación por interacción con ciertos enlaces moleculares presentes en la muestra.

-Luz dispersa (scattered): La radiación es reflejada por la muestra en múltiples direcciones lo que dificulta el análisis NIRS (Manley y Baeten, 2018).

La medición del detector óptico dependerá del rango de absorción en NIR de la muestra a analizar, que varía en función del tamaño de los átomos, fuerza de los enlaces y fuerzas intermoleculares (Siesler et al., 2008). La capacidad de absorción de los armónicos y las radiaciones fundamentales de los compuestos biológicos en el NIR es entre diez y cien veces más débil que en el rango MIR lo que permite una mayor penetración en los alimentos (gran precisión para analizar material biológico no homogéneo) (Porep et al., 2015). Por lo tanto, el análisis de infrarrojo cercano nos aporta una gran información acerca de las propiedades físicas de los alimentos. En medios biológicos, como los alimentarios la interacción de la luz con la muestra invalida el uso de Lambert-Beer (existen múltiples fenómenos de dispersión) (Porep et al., 2015). A este fenómeno se lo conoce como scattering, consiste en la dispersión de la radiación en múltiples direcciones al incidir con algún componente de la muestra (Manley y Baeten, 2018). Por todos estos motivos, se deben aplicar otros métodos quimiométricos para extraer la información (Pasquini, 2003).

1.5.3. Quimiometría

Para interpretar los espectros se debe realizar un análisis quimiométrico de los resultados, mediante aplicación de métodos matemáticos sobre los datos químicos, siendo necesario el uso de un software informático adecuado con paquetes quimiométricos que se ajusten a las necesidades del estudio. Como se indica anteriormente, los datos obtenidos en este tipo de espectroscopia son muy redundantes ya que los espectros se encuentran muy solapados. Es por eso, que debe existir un procesado que nos permita extraer la gran cantidad de información presente de una manera clara. Se puede dividir esta cuestión en tres partes tal y como explican Roggo y sus colaboradores (2007):

-Técnicas de análisis matemático: La función principal de someter los datos a estos tratamientos matemáticos es la reducción del ruido espectral.

-Clasificación de las muestras en función de su espectro: Es la parte cualitativa del análisis. Existen dos tipos de clasificaciones, en las no supervisadas, el análisis se realiza teniendo únicamente conocimiento de los espectros. Posteriormente el espectroscopista debe explicar los patrones de agrupación. Por otro lado, en las clasificaciones supervisadas se requiere un conocimiento previo de la muestra.

-Técnicas de regresión: Su finalidad es establecer una relación entre el espectro y ciertas propiedades cuantificables (parte cuantitativa del análisis).

Los resultados de los análisis quimiométricos en NIRS se muestran como la relación entre $\log(1/R)$. Se considera la reflectancia de la muestra "R", y el número de enlaces químicos específicos.

2. Objetivos:

- 1- Desarrollar la estructura de las bibliotecas espectrales NIRS de la flora vascular apetecible por el Gochu Asturcelta en el monte bajo de castaño de Asturias
- 2- Aplicar algoritmos matemáticos para el desarrollo de modelos de predicción NIRS para la caracterización de los fenoles totales de la flora vascular apetecible por el Gochu Asturcelta
- 3- Aplicar algoritmos matemáticos para el desarrollo de modelos de predicción NIRS para la caracterización de los taninos condensados de la flora vascular apetecible por el Gochu Asturcelta
- 4- Aplicar algoritmos matemáticos para el desarrollo de modelos de predicción NIRS para la caracterización de la capacidad antioxidante de la flora vascular apetecible por el Gochu Asturcelta

3. Material y métodos:

Este trabajo se encuadra en la realización del proyecto de investigación nacional coordinado RTA2014-00051-C04-00, que recibe el nombre "Sostenibilidad de sistemas silvopastorales de frondosas caducifolias iberoatlánticas con razas autóctonas de cerdo en régimen extensivo", del que participan: el equipo investigador de Louziran, que se encarga, entre otras funciones, de analizar la viabilidad de un sistema silvopastoral de

roble gallego y cerdo celta; la Universidad de Santiago de Compostela (USC), en las instalaciones del campus de Lugo que estudia los efectos sobre suelo y vegetación causados por el cerdo celta; el Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Tecnológico (NEIKER-Tecnalia), que estudia la resiliencia de los bosques caducifolios habitados por cerdos y el Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (SERIDA) del Principado de Asturias, que, además de participar en los objetivos comunes del proyecto, desarrolla las aplicaciones relacionadas con la tecnología NIRS con el propósito de optimizar la recogida de espectros en el infrarrojo cercano in-situ de la flora vascular así como de los frutos del castaño. Adicionalmente se pretenden ampliar las bibliotecas espectrales NIRS y desarrollar algoritmos matemáticos para la caracterización bromatológica y antioxidante de la flora vascular y los frutos del castaño que permitan la caracterización del monte bajo de castaño y sirvan para plantear su explotación por el Gochu Asturcelta.

3.1. Trabajo de campo:

La consecución del estudio se llevó a cabo en un castaño de Sela da Loura, una localidad situada en el concejo de Vegadeo (zona occidente de Asturias), a una altitud de 322 m, orientación NO y coordenadas: X: 662213,441 Y: 4805842,341. Al considerarse un hábitat propicio para el cebo y acabado en extensivo del Gochu Asturcelta. Se dividió el terreno en seis parcelas, tal y como se muestra en la **Fig. 3.1**, de las cuales, tres fueron utilizadas como parcelas testigo en las que no se introdujeron cerdos: T1 con una superficie de 3430 m², la parcela T2 con un área de 5253 m² y T3 (5057 m²). Las otras tres, sirvieron de parcelas control introduciendo una carga ganadera de 2,5 cerdos Asturceltas por hectárea en cada una de ellas. Cabe destacar, además, que las parcelas control presentan unas superficies superiores a las utilizadas como testigo (C1 posee un área de 14666 m², C2 dispone de un área de 19545 m² y, por último, C3 tiene una extensión de 15547 m²). Destacó la predominancia de fuertes pendientes en todas las parcelas, superando el 40% en todos los casos a excepción de T1. Una vez divididas, se colocaron cinco varillas en cada una de las parcelas de control (con cerdos). En la **Fig. 3.1** se representan estos puntos en color azul. Todas las varillas fueron identificadas mediante un código. Dentro de estas fincas existen zonas boscosas con estrato arbóreo desarrollado y otras áreas pratenses. De las 5 varillas presentes en cada una de las parcelas se colocaron tres en zonas boscosas y las dos restantes en

prado, que sirvieron como puntos de muestreo para la recogida de biomasa. Es importante aclarar que, la distribución de las varillas fue aleatoria. Los puntos de muestreo fueron determinados mediante la función aleatoria del programa Excel.

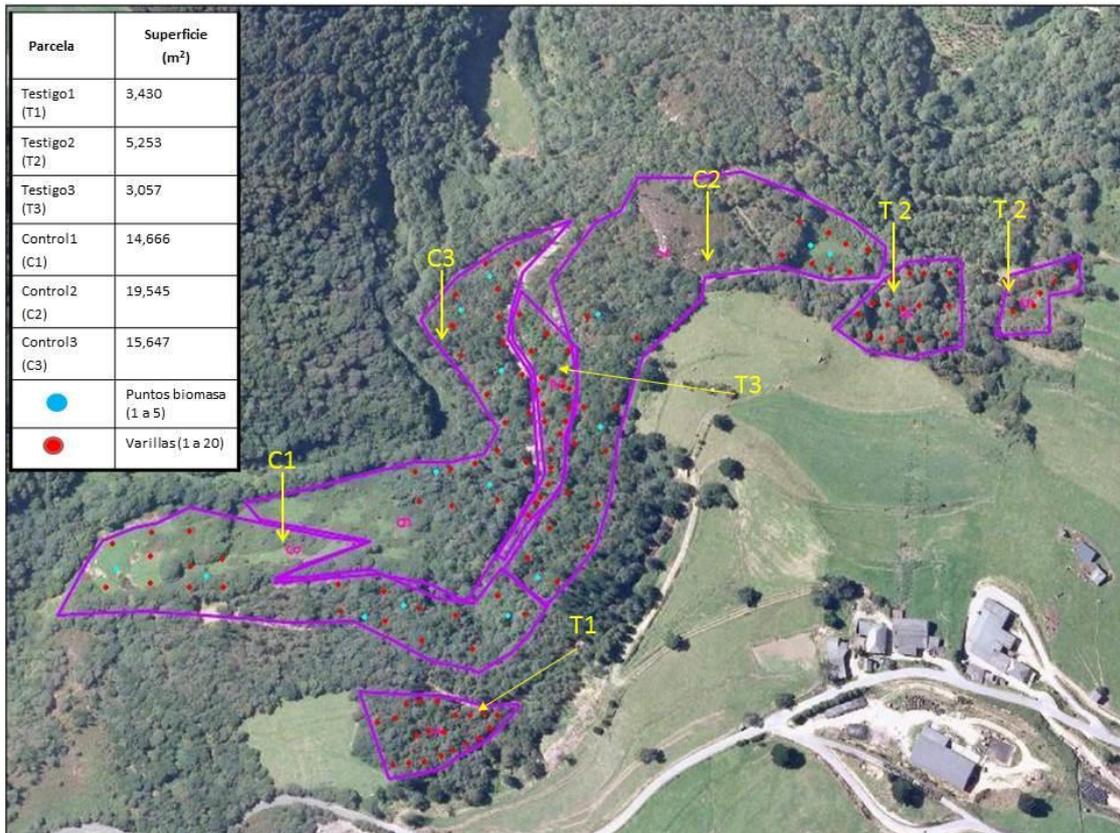


Fig. 3.1 Imagen aérea de las parcelas donde se realizó el estudio indicando su área respectiva y los puntos de recogida de biomasa en las parcelas Control

Se recogió la biomasa en cuadrados de 2 metros de lado, en torno a la varilla colocada previamente. Primeramente, antes de proceder a la obtención muestral se realizó un inventario florístico en cada zona muestreada anotando el índice de abundancia de cada taxón y porcentaje de cobertura de cada especie, también de la materia muerta y de otras plantas (matas o árboles que impedían recoger la biomasa). Posteriormente, se llevó a cabo la recogida (frutos, hojas caídas etc.) o el corte a ras de suelo de la vegetación vascular. En el caso de las raíces hozables se extrajeron hasta 10 cm de profundidad en una subparcela dentro de los cuadrados de muestreo con un área de 1 m x 0,1 m. La recolección de las muestras se llevó a cabo siempre a finales de junio, a fin de que la estacionalidad no fuera un factor generador de variabilidad.



Fig. 3.2 Muestreo de la vegetación: a la izquierda bosque, a la derecha. Prado en las parcelas control (C1, C2, C3), empleando 5 cuadrados/parcela de 2 x 2 m. Imágenes cedidas por Ciordia Ara, M.

Para minimizar en la medida de lo posible la pérdida de compuestos antioxidantes, ya que estos son muy inestable y sensibles al deterioro vegetal, las muestras se mantuvieron refrigeradas en nevera durante el transporte al laboratorio.

3.2. Trabajo en laboratorio:

En el laboratorio, inicialmente, se realizó una primera separación de la materia orgánica muerta y de las plantas vasculares vivas. Posteriormente se llevó a cabo, una clasificación taxonómica de las muestras, con el objetivo de separar la vegetación vascular viva en la fracción apetecible total (VAT) y la fracción no apetecible (VNA) (**Fig. 3.3**). Esta separación se realizó mediante un análisis visual, observando que plantas ingerían los cerdos y cuales rechazaban. Así mismo, para confeccionar las muestras se agrupó la vegetación apetecible por familias taxonómicas, siempre que existía cantidad suficiente. Tras este proceso de agrupación, se obtuvieron 63 muestras diferentes clasificadas por: fecha de recogida (año 2016, 2017 o 2018), punto de recogida (varilla entorno a la que se realizó el muestreo) y familia taxonómica a las que pertenecían los vegetales analizados.



Fig. 3.3 División de las muestras de vegetación en el laboratorio en materia muerta, fracción apetecible (VAT) y fracción no apetecible (VNA). Imágenes cedidas por Ciordia Ara, M.

Tanto las raíces hozables como una alícuota de cada muestra de vegetación apetecible fueron destinadas a la cuantificación del contenido en materia seca (MS) para determinar la producción en gramos por hectárea de terreno y, por otro lado, para realizar los análisis químico-bromatológicos mediante la tecnología NIRS, que ha sido descrita con anterioridad. Los materiales vegetales analizados de esta manera permanecieron en fresco desde su obtención en el campo por este motivo, fue fundamental realizar las mediciones lo más rápidamente posible.

3.2.1. Análisis mediante NIRS: Construcción de librerías espectrales NIRS:

Para llevar a cabo los análisis NIRS en este estudio se ha utilizado el equipo MicroPHAZIRTM fabricado por la empresa estadounidense Thermo Fisher Scientific Inc. Posee una fuente de luz incandescente de tungstenio que asegura la integridad de las muestras analizadas. En cuanto a la detección, posee un único sensor de amplio espectro (InGas) lo que permite una gran eficiencia en cuanto a gasto energético y garantiza una correcta respuesta espectral captando bandas muy amplias de radiación. Se recoge información espectral comprendida entre los 1596 – 2396 nm de longitud de onda a intervalos de 8 nm aproximadamente (observar en la **Fig. 3.6** el espectro resultante). En este instrumento la superficie efectiva de irradiación es de 0,13 cm². El equipo posee una referencia integrada que permite calibrarlo con facilidad.



Fig. 3.4 Medición de muestra de vegetación apetecible con equipo portátil MicroPhazirTM

En cuanto a sus caracteres morfológicos, MicroPhazirTM es un instrumento con forma de pistola lo que permite un uso sencillo e intuitivo, además su peso inferior a 2 Kg

permite una gran portabilidad y comodidad de uso. Se trata de un equipo portátil cuya batería tiene una vida media de 10 horas, otorgándole gran autonomía (Llano Suarez, 2016).



Fig. 3.5 Vista lateral del equipo portátil MicroPhazir™ utilizado durante el estudio

El análisis para la construcción de las librerías espectrales NIRS se realizó, exclusivamente sobre la fracción apetecible, ya que, son las plantas que conforman la mayor parte de la alimentación del Gochu Asturcelta en extensivo. Para ello, el análisis NIRS sobre la VAT y en las fracciones vegetales mayoritarias, consistió en la recogida de 15 espectros por muestra, en distintos puntos al azar, sobre la muestra intacta, siendo cada espectro el promedio de 80 subespectros. El espectro representativo final de cada muestra es el promedio final de los 15 espectros tomados en cada muestra. En la **Fig. 3.6** se muestra el espectro promedio obtenido como resultado del análisis de vegetación herbácea apetecible para el Gochu Asturcelta, así mismo puede observarse una escala en la parte izquierda de la pantalla expresada como $\log(1/R)$.

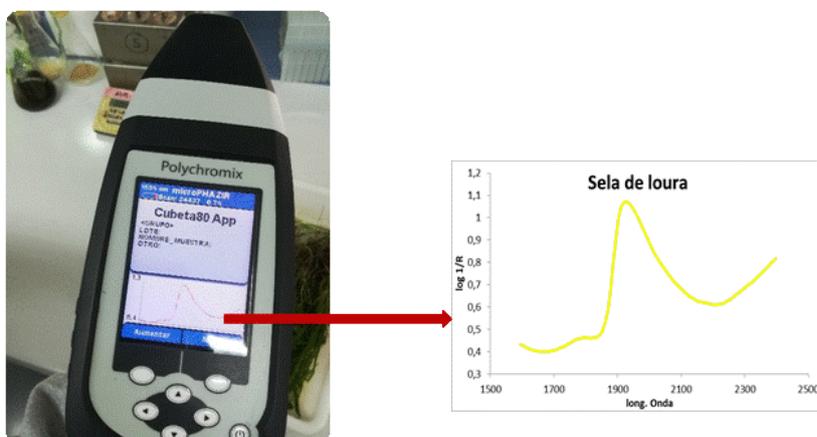


Fig. 3.6 Espectro resultante de la medición en una muestra de vegetación apetecible para el Gochu Asturcelta

Las librerías espectrales NIRS sobre las muestras de vegetación apetecible para el Gochu Asturcelta creadas por el SERIDA fueron ampliadas con nuevos datos aportados por el CIF de Lourizán de Galicia y el NEIKER Tecnalia del País Vasco.

3.2.2. Análisis mediante técnicas de referencia:

Una fracción de cada muestra al llegar del campo a las dependencias del SERIDA recibió un tratamiento de liofilización a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ para evitar el deterioro del material vegetal hasta el momento en que se acometieron los análisis de referencia.

Las muestras fueron analizadas por el grupo de Investigación Forestal del SERIDA, en las dependencias del Centro Tecnológico de la Madera (CETEMAS) ubicado en Carbayín (Siero) donde se efectuaron las medidas de referencia de fenoles totales (FT), taninos condensados (TC) y de la capacidad antioxidante (CA).

3.2.2.1. Extracción de fenoles:

Para cuantificar los FT se utilizó el ensayo Folin-Ciocalteu descrito en el Compendium of International Methods of Analysis (2019). Primero para extraer los compuestos fenólicos de las muestras se re-suspendieron 100 mg de muestra en 5 ml de una solución al 80% de volumen de metanol. La mezcla se purgó 30 s con argón y se agitó durante 2 horas. Después se centrifugó. El sobrenadante se puede almacenar a -20°C . El sobrenadante recibió un tratamiento con NaOH ajustando después el pH a 2,5 con HCl para precipitar los compuestos que se extraen con dietil éter. Después se evaporó el éter y se resuspendieron los fenoles en 80% en volumen de metanol (Niño Medina et al., 2017).

Una vez extraídos los fenoles de las muestras, añadiendo el reactivo de Folin-Ciocalteu, que es una mezcla de ácido fosfotungsténico y ácido fosfomolibdénico, se oxidaron todos los compuestos fenólicos extraídos previamente de la muestra (Compendium of International Methods of Analysis, 2019). De esta forma, los fenoles pasaron a absorber radiación en el rango del espectro visible. Se utilizó como medida de referencia la concentración de ácido gálico (Sanz et al., 2010). La espectrometría se realizó a una Abs de 765 nm (Ainsworth y Gillespie, 2007). Los resultados de las muestras se obtuvieron por interpolación a partir de una curva de calibrado que correlaciona en el eje de abscisas (x) las concentraciones conocidas de los patrones de ácido gálico

(expresadas en mg/L) con el eje de ordenadas (y) en el que se representan las respuestas fotométricas (medidas de absorbancia referentes a cada concentración de ácido gálico), que responden a una ecuación del tipo: $y = a + b x$ (Baizán et al., 2018).

3.2.2.2. Taninos condensados:

Para la medida de taninos condensados, se utilizó el ensayo de la vainillina (Sun et al., 1998; Baizán et al., 2018) se añadió una pequeña cantidad de muestra liofilizada y molida junto con vainillina disuelta en metanol en una concentración de 1% masa/volumen y ácido sulfúrico (H₂SO₄) al 25% (v/v) en metanol. Debe tenerse en cuenta que el ácido tiene un papel catalítico en la reacción de la vainillina con las catequinas (Sun et al., 1998). La vainillina tiene una función análoga a la del reactivo de Folin-Ciocalteu, permitir que las catequinas adquieran un rango de absorbancia máxima a 500 nm. Otro factor a tener en cuenta es la temperatura de la reacción, consiguiéndose unos picos de absorbancia mayores a temperaturas comprendidas entre 25°C y 35 °C (Sun et al., 1998). Así mismo, se utilizaron soluciones estándar de concentraciones conocidas de catequinas para obtener una curva patrón conformando una expresión análoga a la obtenida en la determinación fenólica ($y = a + b x$). Como blanco se usó metanol (Baizán et al., 2018).

3.2.2.3. Capacidad antioxidante:

Para analizar la capacidad antioxidante de las muestras se midió la capacidad de absorbancia de los radicales de oxígeno en las muestras, conocida por sus siglas en inglés (ORAC), siendo este, un método muy popular con un coste bajo económico. El ensayo ORAC mide la pérdida de fluorescencia que hay en una sonda por daños provocados por los radicales libres que contiene la muestra. La inhibición de estos radicales tiene una correlación con la capacidad antioxidante de la muestra. Es decir, a mayor capacidad antioxidante de la muestra menor daño sobre las sondas fluorescentes. Es habitual construir curvas de calibrado con un compuesto antioxidante llamado comúnmente Trolox (Acido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) que se encuentra estandarizado y es propicio para calcular las ORAC. Estas curvas de calibrado se construyen en base al tiempo de actuación del Trolox, a su concentración (eje de abscisas) y % de fluorescencia (eje de ordenadas), como se muestra en la . A mayor concentración del Trolox más tiempo permanece la sonda de fluorescencia sin

recibir daños y, por tanto, su capacidad para emitir fluorescencia intacta. La estandarización del método permite en la actualidad la creación de bases de datos muy amplias para calcular la concentración de una amplia gama de compuestos. La capacidad antioxidante se mide como la integral del área bajo la curva construida en cada caso (Brescia, 2012). Tal y como podemos apreciar en la , la fluorescencia permanece intacta un mayor tiempo a mayor concentración de compuestos antioxidantes.

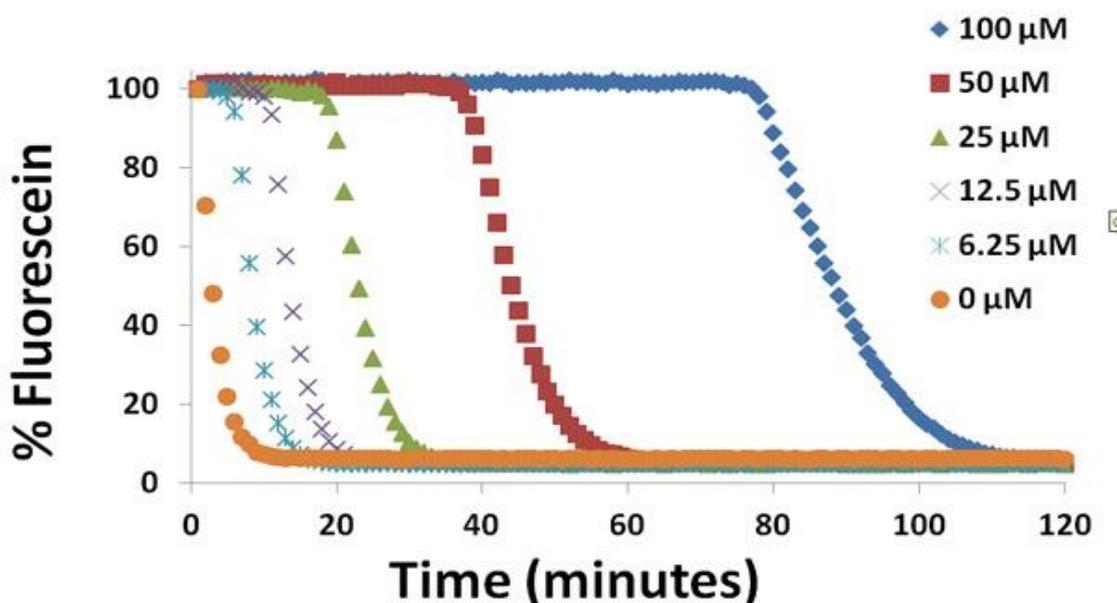


Fig. 3.7 Curvas de fluorescencia en función de la concentración de Trolox y del tiempo de exposición de la sonda de fluorescencia

3.3. Clasificación y análisis de los datos de referencia:

Todos los datos de referencia obtenidos se introdujeron a una base informática creada con el programa Microsoft Office Excel en la que indicamos en diferentes columnas: el código de identificación de la muestra. Por ejemplo, I16-20488 indica: “I” muestra interior recogida por el SERIDA, “16”, recogida el año 2016, y “20488” es el número de la muestra. También se compiló la identificación de la parcela y punto de recogida, fecha de obtención, la familia taxonómica de la vegetación analizada en cada muestra, la cantidad de fenoles totales (FT) expresada en mg Equivalentes de ácido gálico (EAG)/g peso seco, la cantidad de taninos condensados (TC) en mg equivalentes de Catequina (EC)/g peso seco y la capacidad antioxidante (CA) que expresamos como μ moles de equivalentes de Trolox (ET) / g peso seco.

Una vez organizados los datos de referencia, uno de los objetivos del estudio (ver sección de Objetivos) fue analizar las diferentes concentraciones de fenoles totales, taninos condensados, así como, la capacidad antioxidante de las muestras vegetales verificando la existencia o no de diferencias significativas entre los grupos vegetales muestreados.

Debido a que en dos de los tres parámetros analizados no se posee una distribución normal de los datos (taninos condensados y capacidad antioxidante) y en otros dos las varianzas de los datos para los diversos grupos de vegetación no son homogéneas (fenoles y taninos) (Ver en el apartado de Resultados). Se acudió a la estadística robusta para evitar que la presencia de los valores atípicos generara dificultades durante el análisis (Daszykowsky et al., 2007).

3.4. Desarrollo de calibraciones NIRS:

El objetivo a continuación fue establecer una ecuación matemática que relacionara con la mayor linealidad posible los datos espectrales tomados con la cantidad de fenoles totales (FT), taninos (TC) y capacidad antioxidante (CA) de referencia. Para lograrlo, se utilizó el programa Unscrambler X v10.3 (Camo Software AS). Es un programa para el análisis de datos multivariantes que permite establecer una amplia gama de relaciones internas entre los datos.

Para ello la base de datos se estructura sobre una matriz en la que se recogen los 100 datos obtenidos para las diferentes longitudes de onda a intervalos de 8 nm en una franja comprendida entre los 1596–2396 nm, ordenados en columnas; y las 63 muestras de vegetación apetecible ordenadas por filas. El objetivo consistió en establecer una correlación lineal fuerte, entre los datos de referencia obtenidos en laboratorio (se describieron los procedimientos de análisis anteriormente) y los espectros recogidos mediante el equipo portátil MicroPhazirTM para confirmar su viabilidad a la hora de analizar la composición química de las muestras vegetales. La reflectancia de las muestras (expresada en el eje Y de la función espectral como $\log 1/R$) depende de factores físicos, así como, de la composición química de las muestras a lo largo del rango espectral de medida.

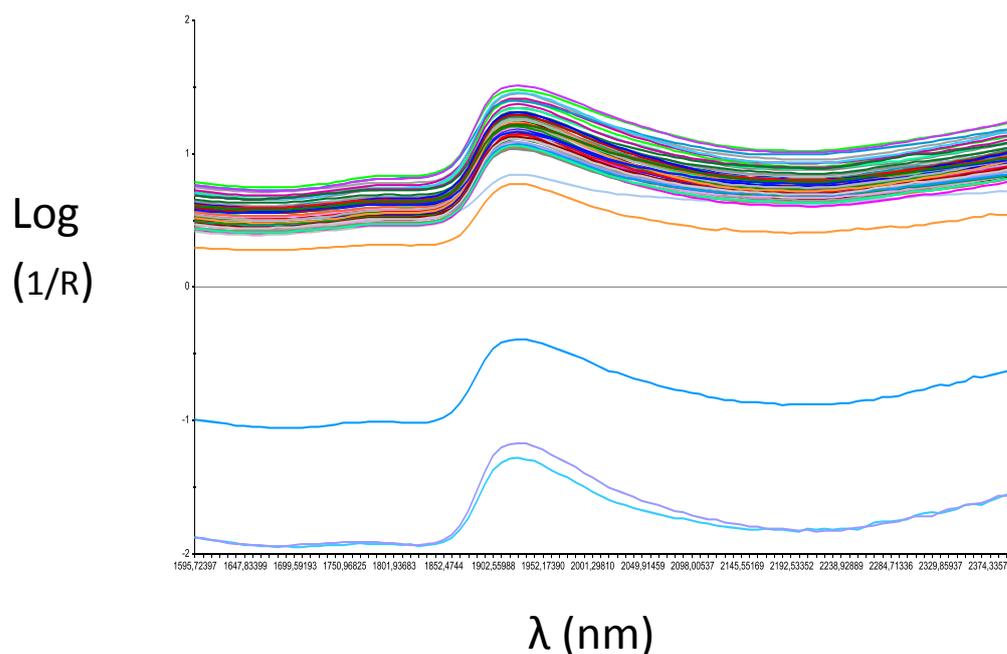


Fig. 3.8 Espectros individuales de la población de vegetación apetecible

El procesado de datos espectrales precisó de diversos tratamientos matemáticos que pudieron ser aplicados individualmente o de manera combinada para reducir lo más posible el ruido espectral. La reflectancia difusa (scattered), recogida en los espectros de infrarrojo cercano se debe principalmente a variaciones en algunas propiedades físicas de las muestras, las más destacables son: fluctuaciones en la temperatura de cada muestra, densidad molecular o grado de concentración de los átomos en cada muestra y la más importante es la variación en los tamaños y texturas de partícula (Yulia y Suhandy, 2018; Pasikatan et al., 2001), ya que va a incidir sobre la pendiente del espectro, también tiene su influencia la densidad molecular (Barnes et al., 1989).

Por otro lado, como se citó con anterioridad se buscó establecer una relación lineal sólida con los datos de referencia. Para ello, en este estudio se utilizaron 5 tratamientos matemáticos diferentes: en primer lugar se utilizó un tratamiento de estándar normal variate (SNV) (Barnes et al., 1993), después se aplicó un SNV combinado con una derivación Savitzky-Golay de orden 1, en tercer lugar se realizó una corrección del espectro multiplicativo de la dispersión (MSC) (Martens et al., 1983) junto con una derivada Savitzky-Golay de primer orden (Chen et al., 2013), los dos últimos tratamientos matemáticos consistieron en dos derivativos Savitzky-Golay (de primer y segundo orden respectivamente).

Cada tratamiento señalado se aplicó a cada uno de los datos espectrales (variable X) para cada una de las variables respuesta: fenoles totales, taninos condensados y para la capacidad antioxidante.

3.5. Tratamientos matemáticos:

3.5.1. Tratamiento SNV:

El tratamiento de estándar normal variate, conocido por sus siglas en inglés (SNV) se utiliza en tecnología NIRS para corregir el ruido generado por las diferencias en el tamaño de partícula (variaciones en la pendiente y divergencia entre los datos para cada longitud de onda) (Barnes et al., 1989). El fundamento del tratamiento SNV consiste en calcular los valores medios de absorbancia y restarlos a cada uno de los 100 datos tomados para las diferentes longitudes de onda, dividiendo el resultado entre la desviación estándar (Dhanoa et al., 1994). Posteriormente se reduce la desviación hasta que quede introducida dentro de unos márgenes. De esta forma se eliminan las variaciones en la pendiente que generan los diversos tamaños de partícula. Por otro lado, cabe destacar que se aplica sobre cada dato espectral individualmente (Dhanoa et al., 1994). El resultado se muestra en la **Fig. 3.9**, en comparación con los espectros que no han recibido tratamiento se aprecian trazos más definidos (se detectan de manera más precisa los cambios de reflectancia). Por otro lado, se observa que la dispersión espectral se reduce considerablemente.

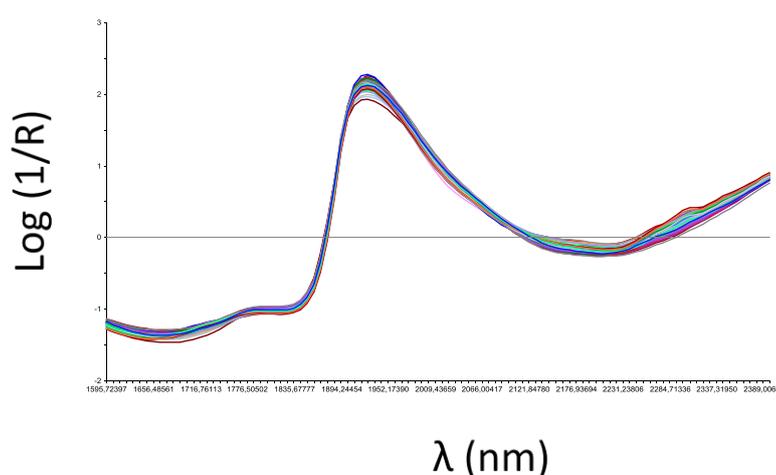


Fig. 3.9 Espectros de datos sometidos a tratamiento standard normal variate.

3.5.2. Tratamientos derivativos:

En el caso de este estudio se obtuvo una elevada cantidad de ruido debido a la variabilidad y heterogeneidad de las muestras, así como a la pequeña ventana de muestreo del equipo utilizado teniendo en cuenta que las muestras se están analizando en su estado natural tras el corte en las parcelas del monte. Los tratamientos derivativos Savitzky-Golay consiguen reducir el efecto aditivo y multiplicativo del ruido en el espectro. Las derivadas de primer orden actúan eliminando la variabilidad espectral (el ruido propiamente dicho), tal y como se aprecia en la **Fig. 3.8** en comparación con los espectros sin tratar (**Fig. 3.6**), mientras que mediante derivadas de segundo orden, se modifica también la tendencia del espectro, provocando variaciones en su forma (Rinnan et al., 2009), esto puede observarse nítidamente en los espectros de la **Fig. 3.9**, obtenidos con el equipo MicroPhazirTM, donde se aprecian unas pendientes mucho más pronunciadas que para el resto de tratamientos. El mayor suavizado del espectro, aunque consiguió reducir el ruido espectral (baseline), por contra, conllevó importantes pérdidas de información, debido a la gran deformación de los espectros tratados con derivativos de segundo orden. Por lo que tanto el ruido como la información que nos aporta el espectro se ven mermados (Romero Gamero, 2002; Chen et al., 2013). En la **Fig. 3.11** **Fig. 3.9** se observan valores de $\log(1/R)$ entre 10 y 100 órdenes de magnitud menores que para los datos sin tratar (uno o dos órdenes logarítmicos) (se aprecia con mayor nitidez en la **Fig. 4.7** y **Fig. 4.12**), lo que implica una gran pérdida de información en el espectro, presentando una sensibilidad muy baja a los cambios en la reflectancia para las diferentes longitudes de onda analizadas en cada una de las muestras. Por otro lado, las oscilaciones en el espectro se suavizan en los mismos órdenes de magnitud por lo que se encuentran también muy reducidas (observar que la escala de este espectro está aumentada).

La combinación de un standard normal variate (variable normal estándar) con un Savitzky-Golay, minimiza el ruido espectral a la par que maximizar la información aportada por los datos, ya que aumenta la sensibilidad a cambios en la reflectancia.

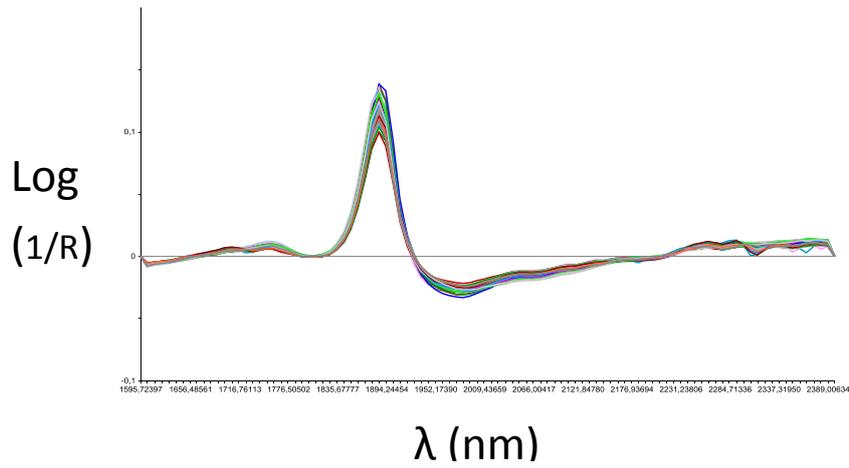


Fig. 3.10 Espectros de datos sometidos a tratamiento derivativo Savitzky– Golay de primer orden.

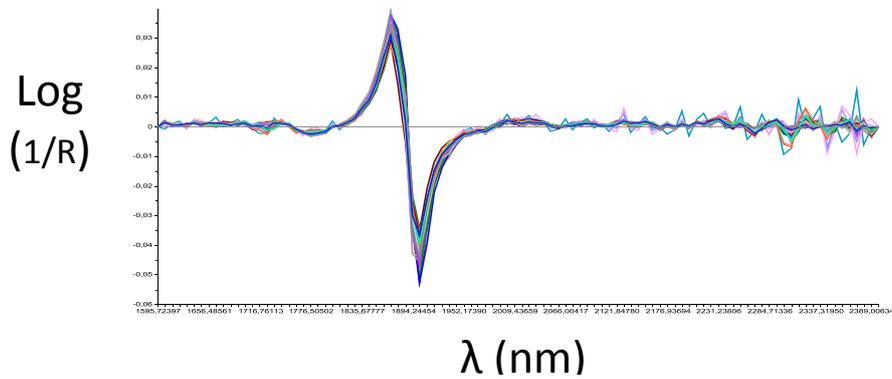


Fig. 3.11 Espectros de datos sometidos a tratamiento de derivativo Savitzky– Golay de segundo orden.

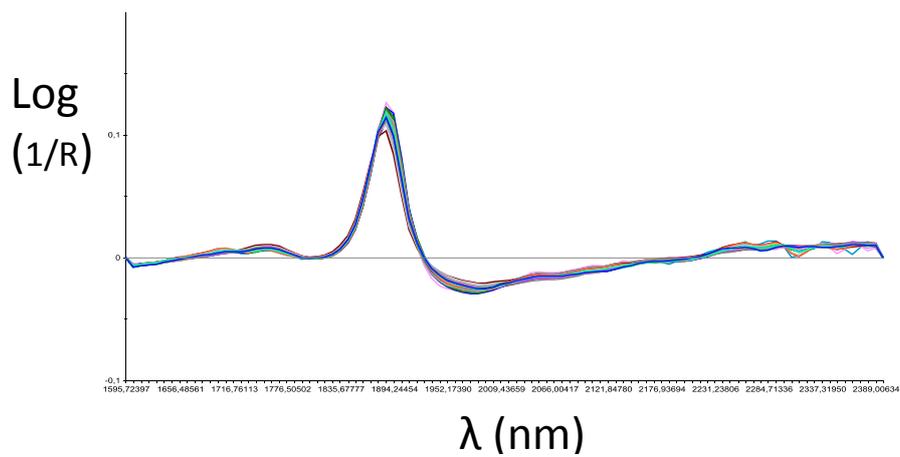


Fig. 3.12 Espectros de datos sometidos a tratamiento SNV combinado con un derivativo Savitzky– Golay de primer orden.

3.5.3. Tratamiento MSC:

El tratamiento de Corrección del efecto multiplicativo de la dispersión fue propuesto por Martens (Martens et al., 1983) y desarrollado dos años después por Geladi y sus colaboradores (Geladi et al., 1985). Tiene la misma función que el anterior. La principal diferencia radica en que, se calcula el espectro promedio y posteriormente se realizan regresiones lineales de los espectros pertenecientes a cada una de las muestras comparándolos con el promedio para cada longitud de onda (cada punto del espectro) (Dhanoa et al., 1994). Después, en base a estas comparaciones se estiman los coeficientes de corrección oportunos y se agrupan los espectros entorno al promedio (Rinnan et al., 2009). El MSC se aplica combinado con un tratamiento derivativo de primer orden, para de esta manera, al igual que con el SNV, reducir el ruido espectral al tiempo que se mejora la sensibilidad frente a los cambios en la reflectancia.

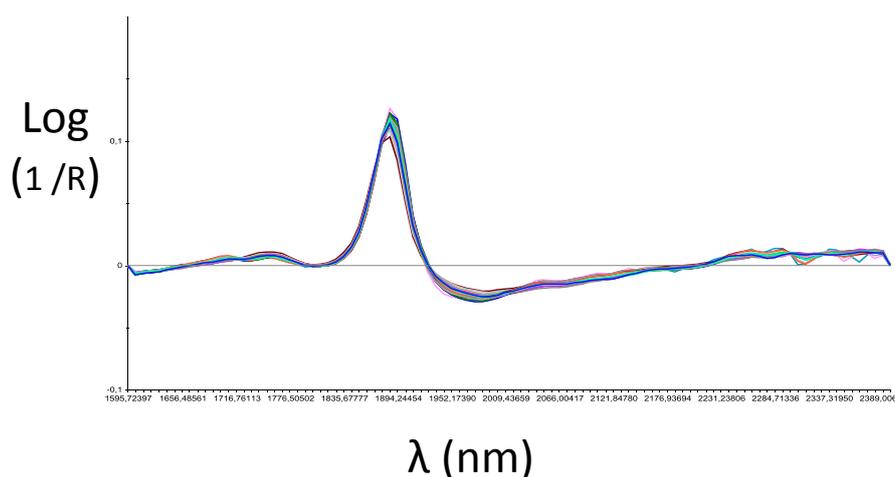


Fig. 3.13 Espectros de datos sometidos a un tratamiento MSC combinado con una derivada primera Savitzky–Golay.

Existe una evidente relación lineal entre los tratamientos SNV y MSC por lo que el resultado de su aplicación resulta equivalente (Dhanoa et al., 1994; Fearn, 2009). Se puede apreciar una gran similitud morfológica entre ambos espectros, representados en la **Fig. 3.12** **Fig. 3.10** y la **Fig. 3.13**

3.6. Análisis cuantitativo de los datos:

Este tipo de análisis que es el más extendido entre las aplicaciones de la tecnología NIRS, se utiliza para estimar la concentración de un analito en una muestra determinada e implica el desarrollo de una ecuación matemática entre los datos espectrales en este trabajo expresados como $\log(1/R)$ y los datos de referencia. En el análisis NIRS esta etapa se conoce como etapa de calibración, que una vez desarrollada permite conocer o predecir el contenido del analito/s en muestras desconocidas siempre y cuando sean similares a las utilizadas para el desarrollo del modelo (Shenk y Westerhaus, 1995; Shenk y Westerhaus, 1996).

Existen diferentes métodos de regresión, pero los utilizados en este trabajo fueron el análisis de los componentes principales (PCA) y el análisis de mínimos cuadrados parciales (PLS). El análisis por PCA tiene en cuenta los factores que más influyen en la variabilidad de los datos obviando otros elementos secundarios mostrando los datos, tan solo, en función de esos componentes más relevantes (principales) de variabilidad, como podría ser en este caso el tamaño de partícula, obteniendo una aproximación simplificada de la realidad (Jolliffe y Cadima, 2016), mediante la generación de nuevas variables ortogonales no correlacionadas entre sí, denominadas componentes principales (CPs) para modelar los datos espectrales que explican la mayor parte de la variación de los datos a esto se lo llama score. Los datos son proyectados sobre estos vectores principales obteniendo como resultado un espectro completo. La combinación lineal de varios términos permite una descripción completa de los espectros (Barnes et al., 1989). En el caso de determinados materiales agrícolas, como la vegetación que estamos estudiando, una sola componente puede llegar a explicar cerca del 90% del espectro (Barnes et al., 1989). Este análisis se empleó para realizar una detección de posibles anomalos espectrales. Otra opción para detectar posibles datos extremos consiste en representar gráficamente las líneas espectrales de cada muestra y comprobar si existe alguna que siga una trayectoria anómala o que presente valores de reflectancia atípicos. En la **Fig. 3.6** se observa cómo, tres de los espectros se localizan por debajo de la nube espectral, estos pertenecen posiblemente a outliers muestrales que, de confirmarse no se tendrán en cuenta para medir la correlación entre los datos posteriormente.

El análisis de cuadrados parciales (PLS) se diferencia del PCA en que, para el cálculo de las componentes principales de los espectros, utiliza también la matriz de datos de

referencia de las muestras). Este segundo análisis, permitió predecir los valores de los datos de referencia (una variable) mediante una regresión múltiple a partir de otra variable (los datos espectrales) en un contexto de calibración multivariable, es decir, atendiendo a diversos factores (tamaño de partícula, densidad atómica etc.) (Wold et al., 1987). Mediante el procedimiento de calibración, se estableció la relación existente entre el espectro de absorción y los valores de referencia analizados en laboratorio.

3.7. Estadísticos de evaluación de las ecuaciones de calibración

El error estándar de calibración (SEC), así como el coeficiente de determinación R^2_c de calibración indican el grado de relación del modelo quimiométrico aplicado (López Bautista, 2001). Internamente el programa realizó una validación cruzada, que consistió en dividir los datos espectrales en dos o más grupos y analizar la relación de cada subconjunto con los correspondientes datos de referencia y validar internamente el modelo con el grupo no utilizado para establecer la relación. De esta manera nos cercioramos de la relación descrita por la calibración (Adepipe et al., 2016). Se anotaron el error estándar de calibración (SEC) y el estándar de validación cruzada (SECV), que es el error de los residuales para el grupo de validación cruzada, así, como los R^2 de calibración (R^2_c) y validación cruzada (R^2_v) de los datos sometidos a cada uno de los tratamientos matemáticos (Campo y Moreno González, 2014). Posteriormente, con el objetivo de mejorar la correlación lineal de los datos, se eliminaron los datos outliers y obtuvieron nuevos errores SEC, SECV, así como, los respectivos R^2_c y R^2_v . Se eligió el tratamiento que aportó una mejor correlación lineal a los datos espectrales con cada una de las variables respuesta (R^2 lo más cercano a 1 posible, con SEC y SECV (errores de calibración y validación cruzada más bajos).

Por último, se confeccionó una Tabla resumen con el mejor tratamiento para fenoles totales, taninos condensados y capacidad antioxidante en el que mostramos los R^2 , SEC y SECV óptimos (Ver **Tabla 4.5**). Por otro lado, se recogieron para cada variable estudiada: número de muestras en las que se midió cada variable de referencia, el mínimo (dato de referencia menor), máximo (dato de referencia mayor), desviación estándar de los datos de referencia, promedio y coeficiente de variación (desviación estándar / valor absoluto del promedio) (Abdi, 2010) (**Tabla 4.1**). Todos estos datos se encuentran recogidos en el apartado de Resultados).

4. Resultados:

4.1. Concentración de fenoles totales, taninos condensados y capacidad antioxidante en función de la especie vegetal

Tabla 4.1: Datos de referencia para fenoles totales, taninos condensados y capacidad antioxidante

	Fenoles totales (FT) (mg EAG / g _{ps})	Taninos condensados (TC) (mg EC / g _{ps})	Capacidad antioxidante (CA) (μ mol ET / g _{ps})
Número de muestras	63	63	62
Promedio	8,76	13,54	323,26
Máximo	43,87	85,56	2760,97
Mínimo	0,08	1,28	35,75
Desviación estándar	10,24	17,54	481,65
Coefficiente de variación	1,17	1,30	1,49

En la **Fig. 4.1** se muestran datos de referencia de los siguientes parámetros: fenoles totales (expresados como miligramos de equivalentes de ácido gálico/gramo de peso seco), taninos condensados (cuya unidad de medición es equivalentes de catequina/gramo de peso seco), así como, de capacidad antioxidante (en μ moles de equivalentes de Trolox/gramo de peso seco) pertenecientes a las muestras de vegetación apetecible analizadas en el laboratorio. Se estudiaron 63 muestras de vegetación apetecible, sin embargo, se determinó un error durante la medición de capacidad antioxidante en una muestra de *Erica arborea* por lo que solo dispusimos de 62 datos para este parámetro, como ya indicamos en la sección de Material y métodos.

Observando los datos de desviación estándar, se aprecia una mayor agrupación de los datos entorno al valor promedio para fenoles totales ($s = 10,24$) y en menor medida para taninos condensados ($s = 17,54$). En cambio, la desviación estándar (s) que presentan los datos registrados de capacidad antioxidante con respecto al valor promedio es notablemente más elevada ($s = 481,65$), lo que indica una dispersión de los datos netamente mayor que en los otros dos parámetros estudiados.

También se recogieron los valores más elevados, así como los menores encontrados en una muestra para cada parámetro estudiado. En el caso de los fenoles totales el valor más bajo hallado en una muestra de vegetación apetecible fue de 0,08 mg EAG/g peso seco, perteneciendo a una muestra recogida en zona arbolada. El valor más elevado para este parámetro fue de 43,87 mg EAG/g peso seco en hojas de roble, siendo la vegetación apetecible que más cantidad de compuestos fenólicos posee de las distintas familias muestreadas (consultar el Anexo I). El promedio de todas las muestras es de 10,24 mg EAG/g peso seco.

En taninos condensados la menor concentración de estos compuestos (1,28 mg EC/g peso seco) corresponde a una muestra de vegetación herbácea recogida en el suelo del bosque, mientras que el registro más elevado (85,56 mg EC/g peso seco) pertenece a las hojas de abedul (consultar el Anexo I). El valor promedio es de 17,54 mg EC/g peso seco.

Para la capacidad antioxidante observamos un rango de dispersión de los datos mucho más elevado que en los dos casos anteriores. En este caso el mínimo es de 35,75 μ moles/g peso seco y corresponde a una muestra de gramíneas en el estrato herbáceo de un bosque. El valor máximo es de 2760,97 μ moles/g peso seco, y se midió en una muestra de *Erica arbórea* (consultar el Anexo I).

Por último, debido a que las cifras obtenidas durante la medida de capacidad antioxidante (expresadas en μ moles Trolox/g peso seco) son muy elevadas en comparación con los fenoles totales y los taninos condensados; se calcularon los coeficientes de variación que expresan la heterogeneidad de los datos, teniendo en cuenta el tamaño su promedio. De esta forma, se observa que los datos más homogéneos son los de fenoles totales con un CV = 1,17, los datos referentes a taninos condensados CV = 1,30 y los más heterogéneos corresponden a la capacidad antioxidante, con un CV = 1,49.

En las siguientes graficas se representa la concentración de fenoles totales (**Fig. 4.1**), taninos condensados (**Fig. 4.2**) y capacidad antioxidante (**Fig. 4.3**) hallados en los diferentes tipos de muestra según el entorno de muestreo. En azul, se representan los datos pertenecientes a las muestras obtenidas de plantas herbáceas del sotobosque, en ningún caso corresponden al estrato arbóreo del mismo. Por otro lado, en color rojo, se muestran los valores fenólicos totales de diferentes hojas de árboles, o arbustos como

Vaccinum sp. (arándano), *Rubus sp.* etc. En gris los datos referentes a vegetación pratense como algunas gramíneas, leguminosas etc.

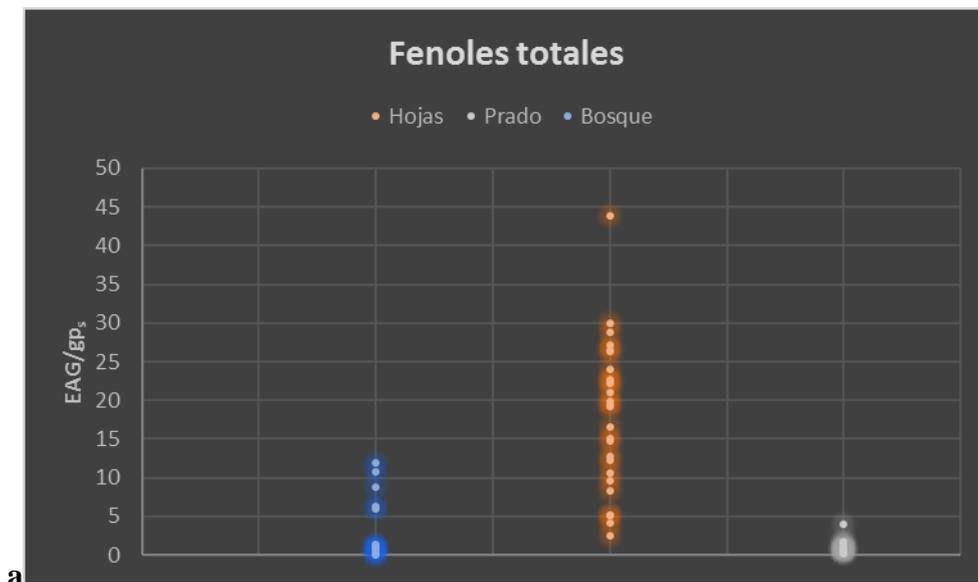


Fig. 4.1 Fenoles totales expresados como EAG/g_{ps} en muestras de suelo forestal, prado abierto y hojas de especies arbóreas

En la **Fig. 4.1** se aprecia claramente que las muestras recogidas en la zona de prado tienen contenidos fenólicos mucho más reducidos que las de origen forestal resultando especialmente elevada la concentración de fenoles hallada en las hojas de árboles como los robles, castaños o abedules (**Fig. 4.4**).



Fig. 4.2 Taninos condensados expresados como EC/g_{ps} en muestras de sotobosque, prado abierto y hojas de especies arbóreas

La **Fig. 4.2** muestra que en la vegetación pratense la concentración media de taninos condensados es muy reducida en comparación con las especies de bosque. Vuelve a ser especialmente elevada en las muestras de hojas de árboles caducifolios como castaño (*Castanea sativa*), roble (*Quercus robur*) o el abedul (*Betula celtiberica*) (**Fig. 4.5**).

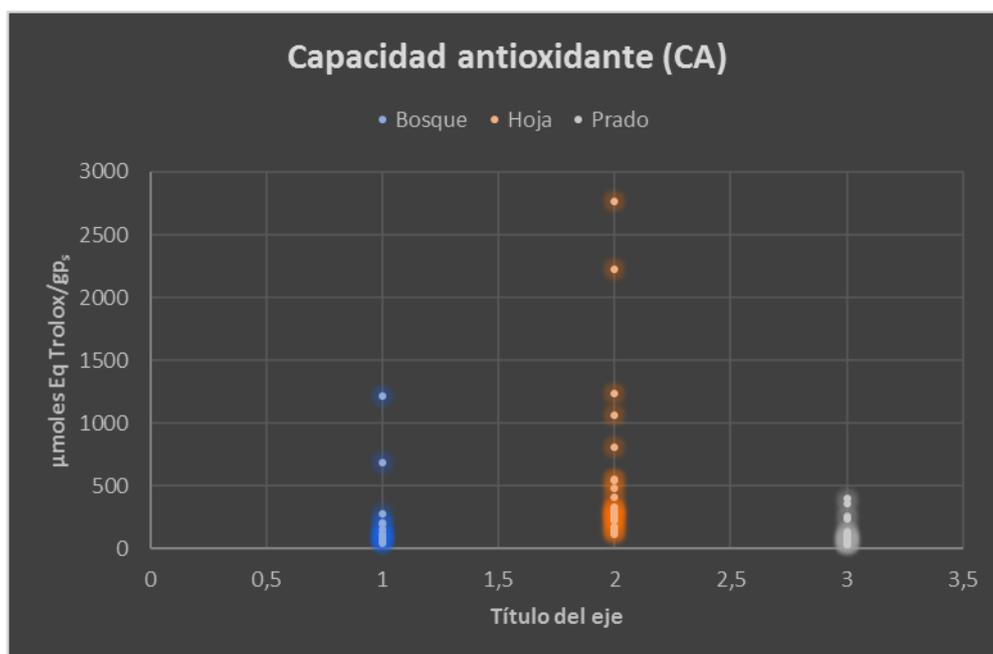


Fig. 4.3 Capacidad antioxidante expresada como $\mu\text{moles Eq. Trolox/g}_{\text{ps}}$ en muestras de suelo forestal, prado abierto y hojas de especies arbóreas

En la **Fig. 4.3** se aprecia el mismo patrón para el resto de los compuestos antioxidantes, siendo esta menor en muestras de prado con especies leguminosas o gramíneas y siendo alta para hojas de árboles o para otro tipo de vegetación perteneciente al sotobosque herbáceo o arbustivo. No obstante, las tendencias no se aprecian tan nítidamente como en fenoles totales y taninos condensados. Cabe destacar que debido a un error durante el procesado se ha perdido el dato de capacidad antioxidante (CA) referente a la muestra I18-22399. Por lo que se trabajó con 63 datos de fenoles totales y taninos condensados y 62 de capacidad antioxidante.

En cuanto al análisis estadístico llevado a cabo, dividiendo las muestras en grupos vegetales más concretos se aprecian de forma más detallada las variaciones en el

contenido de fenoles totales, taninos condensados y capacidad antioxidante para cada fracción (**Tabla 4.2**).

Primeramente, se realizó un test Saphiro-Wilk de normalidad para cada uno de los factores analizados (FT, TC y CA) en base al tipo de vegetación. El análisis confirmó la distribución normal de los datos de referencia tanto para fenoles totales (p-valor = 0,020, p-valor $\leq 0,05$, podemos descartar la hipótesis nula y considerar la distribución normal de los datos), como para taninos condensados, con un p-valor = 0,3135 $\geq 0,05$ (no podemos considerar que los datos referentes a taninos condensados posean distribución normal) y para la capacidad antioxidante en donde se obtiene un p-valor = 0,43 siendo este mayor que 0,05 por lo que la hipótesis nula no se puede descartar no pudiendo considerar la distribución normal de los datos, tampoco para capacidad antioxidante.

Adicionalmente se utilizó la prueba de Bartlett (Bartlett, 1937) para comprobar si existe homogeneidad entre las varianzas de los datos de las distintas agrupaciones vegetales. En el caso de los FT el p-valor fue de 0,901 $\geq 0,05$ por lo que no existe homogeneidad de las varianzas, para los TC se obtuvo un p-valor = 0,104, siendo mayor de 0,05 no podemos considerar homogeneidad de varianzas tampoco para este parámetro y por último, en cuanto a la capacidad antioxidante, el p-valor = 2,76*10E-9, en este caso, como p-valor $\leq 0,05$ si se puede descartar la hipótesis nula y considerar homogéneas las varianzas para todos los grupos vegetales.

En la **Tabla 4.2**, representada inferiormente, Cada uno de los valores lleva asociado una letra (a, b, c, d). Si dos fracciones vegetales tienen asociadas letras diferentes significa que poseen diferencias significativas (p-valor $\leq 0,05$) en el contenido del parámetro correspondiente. De esta manera, en determinadas fracciones vegetales existe una variabilidad dentro de un mismo grupo vegetal en cuanto a la medida de su capacidad antioxidante que se observan varias letras asociadas a la misma fracción vegetal (por ejemplo, *Erica arborea* lleva asociadas las letras “a” y “b”).

Tabla 4.2 Contenido promedio en FT, TC y CA de las diferentes fracciones vegetales. Con sus respectivas desviaciones típicas

Espece o fracción vegetal:	Fenoles totales	Taninos condensados	Capacidad antioxidante
Erica arborea	22,4 ± 0,14 b	46,5 ± 4,75 d	1655 ± 1105,8 ab
Hojas de abedul	10,3 ± 2,43 ab	40,0 ± 14,88 d	368 ± 176,6 ab
Hojas de arandano	15,3 ± 2,92 b	25,6 ± 9,41 d	823 ± 472,9 ab
Hojas de castaño	24,5 ± 2,12 b	6,45 ± 0,69 b	433 ± 207,1 b
Hojas de roble	21,9 ± 5,71 b	18,2 ± 3,79 d	339 ± 98,0 b
Vegetación apetecible general	3,45 ± 0,913 a	7,27 ± 2,036 c	209 ± 52,4 a
Gramíneas	0,77 ± 0,052 a	2,56 ± 0,413 a	100 ± 12,7 a
Leguminosas	2,43 ± 1,043 a	5,50 ± 2,693 a	285 ± 95,9 ab
Otras	4,97 ± 2,457 a	5,38,4 ± 0,210 a	205 ± 89,4 ab

* a, b, c, d: Valores acompañados de distinta letra en una misma columna difieren a $p \leq 0,05$

Observando la **Fig. 4.4**, donde se representan los valores de FT para cada muestra tomada clasificándolas por tipo de grupo vegetal. Así pues, y tras realizar el análisis estadístico pertinente se aprecian diferencias significativas entre las muestras herbáceas (gramíneas (0,77±0,052 EAG/g MS), leguminosas (2,43±1,043 EAG/g MS) y otro tipo de especies de pastizal o pertenecientes al sotobosque (4,97±2,457 EAG/g MS)), cuyas concentraciones en compuestos fenólicos son significativamente menores a las registradas en hojas de distintos árboles caducifolios (*Quercus sp.* (roble), (21,9±5,71 EAG/g MS), *Castanea sativa* (castaño)(24,5±2,12), donde encontramos una concentración de compuestos fenólicos especialmente notable, o regiones foliares de otras especies de porte leñoso como *Vaccinium sp.* (arándano) (15,3± 2,92 EAG/g MS) o *Erica arborea* (22,4 ±0,14 EAG/g MS). En el caso de *Betula celtibérica* (abedul) (10,3±2,43 EAG/g MS), no se encuentran diferencias significativas de compuestos fenólicos con respecto a las herbáceas ni con respecto a otros caducifolios.

Por otro lado, tal y como se indica en la parte derecha del gráfico (color verde claro) puede apreciarse visualmente que las especies del sotobosque (Otras especies (bosque)) poseen un elevado contenido en fenoles si las comparamos con las muestras de gramíneas, leguminosas u otras especies presentes en prado abierto, sin embargo, debido al bajo número muestral, las diferencias en este caso no son significativas.

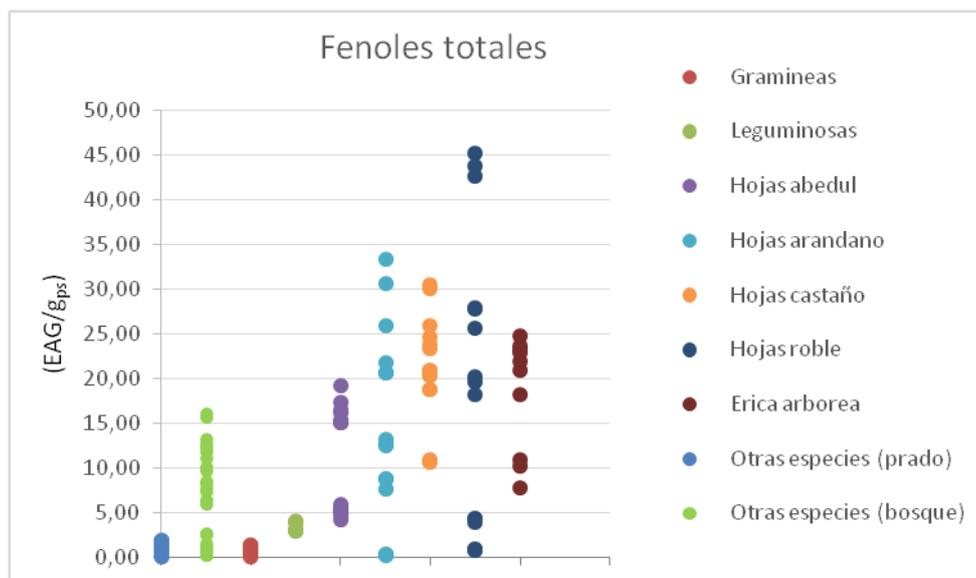


Fig. 4.4 Contenido de fenoles totales de los diferentes grupos vegetales

En la **Fig. 4.5** se aprecia un gráfico análogo al anterior en el que se refleja el contenido en taninos condensados para cada una de las muestras recogidas en función del grupo vegetal al que pertenecen. La vegetación apetecible herbácea (leguminosas ($5,50 \pm 2,69$ EC/g MS), gramíneas ($2,56 \pm 0,41$ EC/g MS) y otras especies ($5,38 \pm 4,21$ EC/g MS)) poseen diferencias significativas de taninos condensados en comparación con las muestras foliares de castaño ($6,45 \pm 0,69$ EC/g MS) con un p-valor $\leq 0,05$ y existe un grupo de vegetación con contenido significativamente más elevado de taninos condensados (p-valor $\leq 0,05$ con respecto a las demás especies vegetales muestreadas) conformado por: hojas de abedul ($40,00 \pm 14,88$ EC/g MS), hojas de arándano ($25,6 \pm 9,41$ EC/g MS), hojas de roble ($18,2 \pm 3,79$ EC/g MS) y *Erica arborea* ($46,5 \pm 4,75$ EC/g MS) (**Tabla 4.2**).

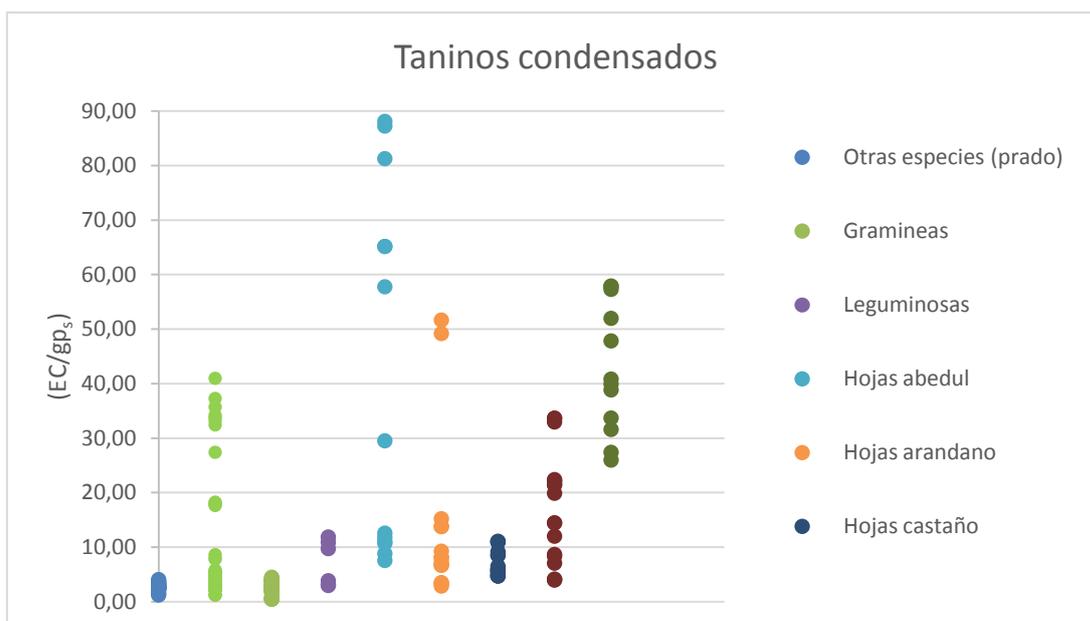


Fig. 4.5 Contenido en taninos condensados de las diferentes especies vegetales

El esquema de la **Fig. 4.6** es relativo a la capacidad antioxidante presente en las diferentes especies vegetales muestreadas y que formarían parte de una hipotética dieta del Gochu Asturcelta en extensivo. En este caso, las diferencias entre los diversos grupos vegetales son menos consistentes que para los dos parámetros analizados anteriormente ya que, como se ha visto previamente la dispersión de los datos es muy amplia. Tan solo se aprecian diferencias significativas (p -valor $\leq 0,05$) entre las gramíneas ($100 \pm 12,7 \mu \text{ mol Trolox} / \text{g MS}$) y las hojas de castaño y de roble con capacidades antioxidantes mucho más elevadas ($433 \pm 127,1 \mu \text{ mol Trolox} / \text{g MS}$ y $339 \pm 98,0 \mu \text{ mol Trolox} / \text{g MS}$ respectivamente) (**Tabla 4.2**). En este caso se aprecian también capacidades antioxidantes más elevadas en muestras de otras especies presentes en el bosque, representadas como un círculo verde claro, en comparación con las de prado abierto representadas en color azul (**Fig. 4.6**), lo que se evidencia también en la **Fig. 4.5** para taninos condensados y fenoles totales en la **Fig. 4.4**.

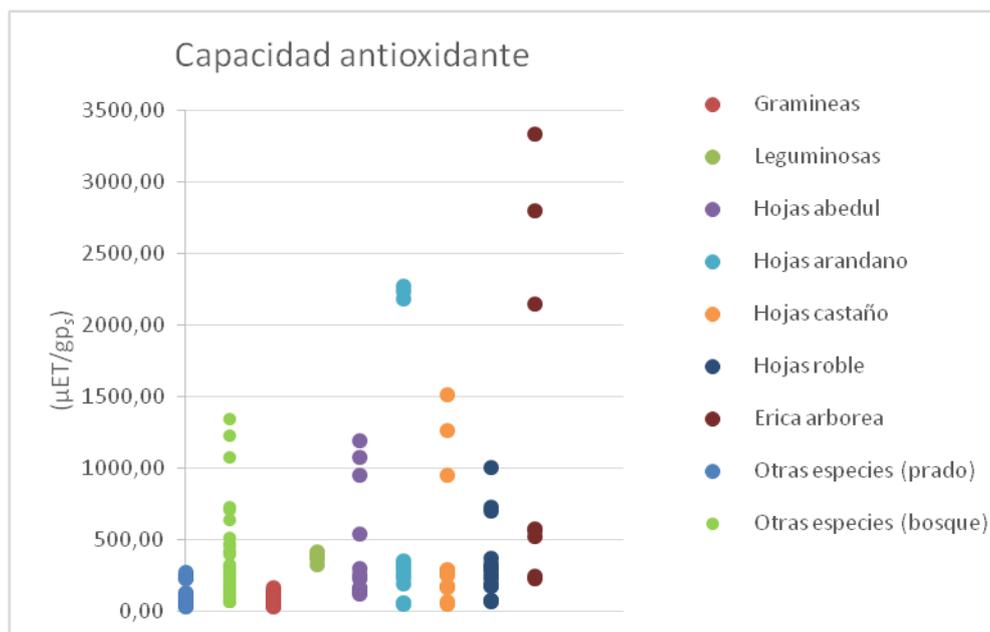


Fig. 4.6 Capacidad antioxidante de los diferentes grupos de vegetales.

4.2 Tratamientos matemáticos aplicados a los datos espectrales:

A continuación, mostramos los espectros promediados para cada uno de los tratamientos que utilizamos a lo largo del estudio. Tal y como se afirma en la sección de Material y métodos los tratamientos matemáticos tienen efectos sobre la morfología del espectro y son fundamentales en la reducción del ruido espectral provocado por la dispersión de la luz y otros efectos físicos, eliminar cambios en la línea de base, etc. No existe una regla fija para elegir el mejor tratamiento matemático, dependerá tanto del tipo de muestras a analizar, como de los parámetros a determinar, basándose la elección para un modelo de predicción concreto en aquellos tratamientos que den como resultado una mayor correlación con los menores errores de predicción.

En la **Fig. 4.7** inferior se muestra el promedio de los 63 espectros medidos con el MicroPhazirTM (uno para cada muestra de vegetación apetecible) previamente a la aplicación de los tratamientos matemáticos.



Fig. 4.7 Espectro NIR promedio perteneciente a las muestras de vegetación apetecible en $\log (1/R)$, sin tratamientos matemáticos

En la **Fig. 4.8** se representa el espectro promedio tras aplicarse sobre los datos un standard normal variate cuyo fundamento se explica con detalle en Material y Métodos. Si se observan los valores de $\log (1/R)$, en comparación con el espectro previo, los valores de respuesta presentan una oscilación mayor, indica por tanto que para variaciones similares en la absorción de radiación NIR se consigue una mayor sensibilidad a la hora de representarlas (se detectan variaciones de absorción menores que si no se aplica tratamiento). Además, al aplicar el tratamiento, se normaliza la distribución de los datos.

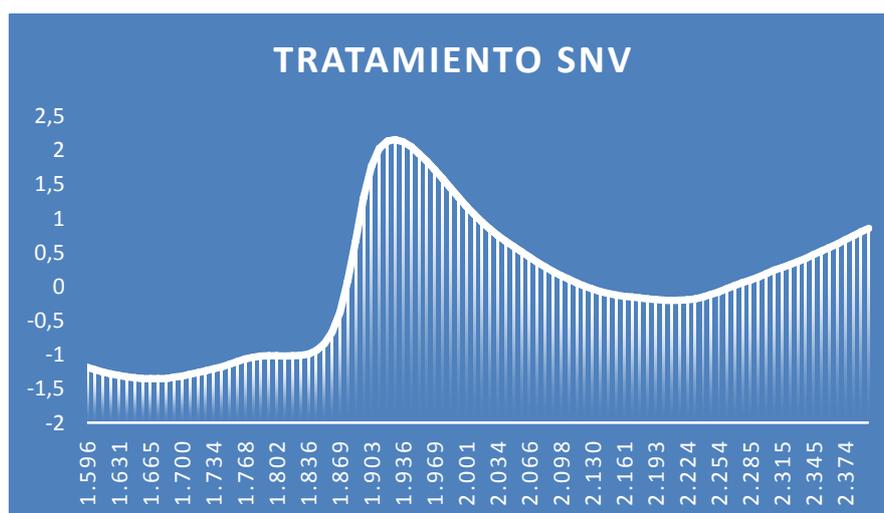


Fig. 4.8 Espectro promedio de las muestras de vegetación apetecible tras aplicar un tratamiento matemático de standard normal variate (SNV).

Combinando el SNV con un tratamiento derivativo de primer orden se obtiene el espectro representado en la **Fig. 4.9** . Al introducir una derivada se observa que la pendiente del espectro aumenta mientras que previamente las variaciones en la absorción eran más suaves. De esta manera, los picos que podrían estar superpuestos en el espectro original pueden aparecer separados tras aplicar la derivación. Como resultado se obtiene un tratamiento que es muy sensible a las variaciones de absorción entre distintas longitudes de onda, pero en el que, por el contrario, el ruido espectral se encuentra amplificado en relación al tratamiento SNV aplicado por separado.

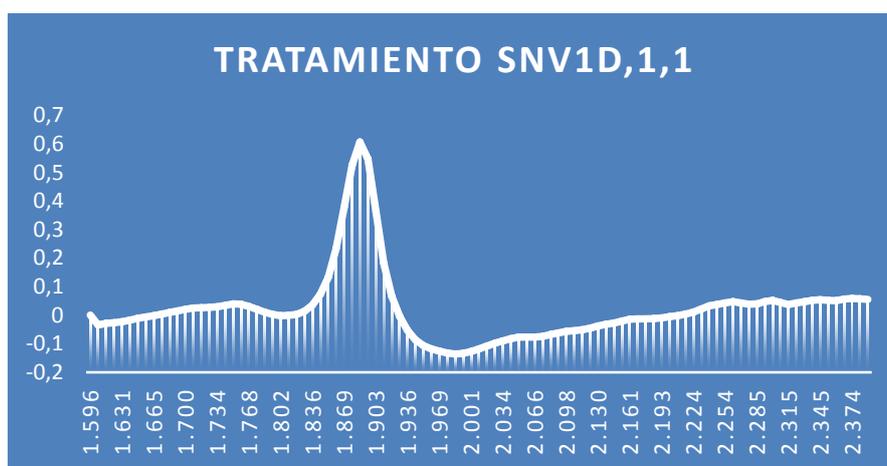


Fig. 4.9 Promedio de los espectros tratados mediante standard normal variate en combinación con una derivada de primer orden

La **Fig. 4.10** presenta el tratamiento MSC o corrección del efecto multiplicativo de la luz difusa combinado con una derivada primera. Aunque se aprecia una morfología similar en el espectro resultante del tratamiento MSC combinado con una derivada primera (Dhanoa et al., 1994) que, en el caso anterior, que puede deberse, como ya se explica en la sección de Material y métodos, a la equivalencia entre los tratamientos matemáticos SNV y MSC. Se debe precisar que esta corrección es una transformación dependiente del espectro promedio del grupo de calibración (Dhanoa et al., 1994).

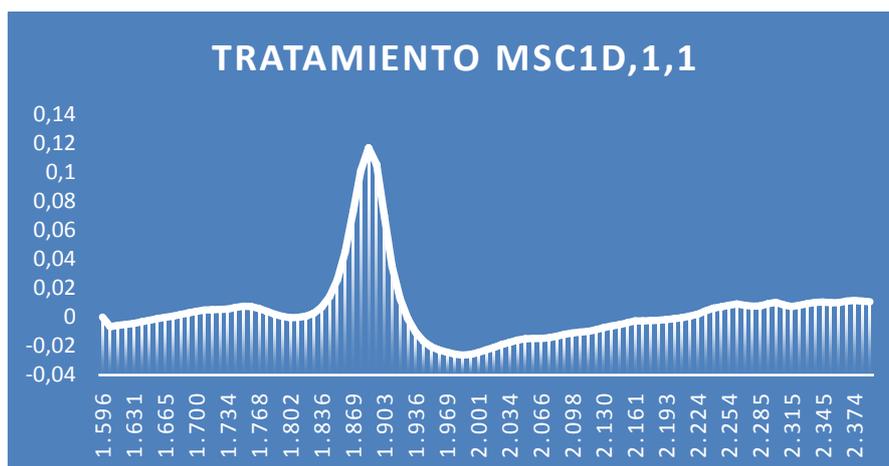


Fig. 4.10 Espectro NIR promedio perteneciente a las muestras de vegetación apetecible tras aplicar un tratamiento matemático MSC combinado con una derivada de primer orden

Aplicando un tratamiento derivativo de primer orden tratamiento derivativo de primer orden el resultado es similar al descrito previamente para los combinados SNV y MSC con una derivada de primer orden.

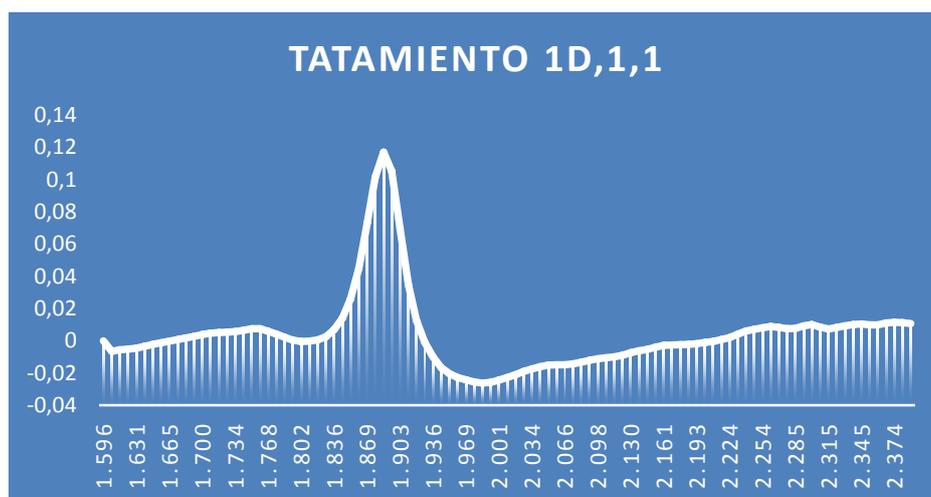


Fig. 4.11 Espectro NIR promedio perteneciente a las muestras de vegetación apetecible siendo aplicada una derivada Savitzky-Golay de primer orden

Tal y como se indica en la sección de Material y métodos al aplicar una derivada segunda sobre los datos espectrales se disminuye entre unos 10 y 100 órdenes de magnitud la sensibilidad a las variaciones en la variable respuesta (esto se observa en los valores de $\log(1/R)$ que son 1 orden de magnitud que para los demás tratamientos). Como resultado la incidencia del base-line (ruido espectral) disminuye notablemente, pero se genera una gran pérdida de sensibilidad frente a los cambios (y por tanto una

pérdida de información). por lo que habitualmente se aplica la derivación conjuntamente con otro tipo de tratamientos.



Fig. 4.12 Espectro NIR promedio perteneciente a las muestras de vegetación apetecible tratando los espectros con una derivada segunda

También se realizaron los tratamientos: standard normal variate en combinación con una derivada primera, así como un Savitzky-Golay de segundo orden eliminando las longitudes de onda extremas (seis a cada lado del rango espectral). El resultado son espectros idénticos a los descritos anteriormente para estos tratamientos, con la diferencia correspondiente a la eliminación de los doce valores más extremos.

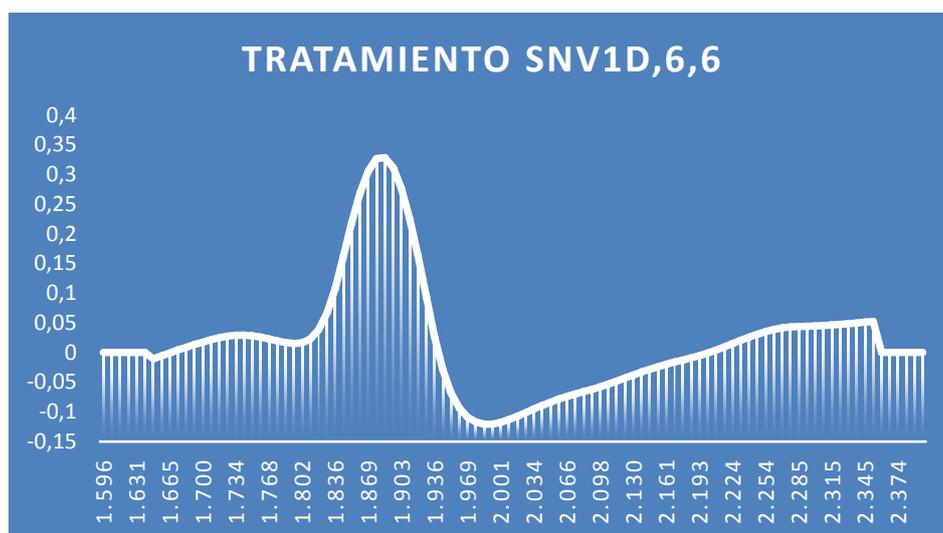


Fig. 4.13 Espectro NIR promedio perteneciente a las muestras de vegetación apetecible tras aplicar un tratamiento de standard normal variate combinado con una derivada Savitzky-Golay de primer orden eliminando los seis valores extremos a cada lado del rango de medida



Fig. 4.14 Espectro promedio aplicando una derivada segunda eliminando los seis valores extremos a cada lado del rango de medida

A continuación, se muestran los resultados obtenidos para los diferentes modelos de calibración desarrollados, en función de los coeficientes de determinación para la calibración y validación cruzada, así como los respectivos errores de calibración (SEC) y validación cruzada (SECV). En la **Tabla 4.3** se muestran los resultados pertenecientes a fenoles totales, en la **Tabla 4.4**, los referentes a taninos condensados y, por último, en la **Tabla 4.5** los resultados correspondientes a capacidad antioxidante. De acuerdo a los criterios de (Shenk, 1986), los valores obtenidos para el coeficiente de determinación de la validación cruzada determinan el tipo de calibración obtenida:

$R_v^2 > 0,90$: calibración excelente

$0,89 > R_v^2 > 0,70$: calibración buena

$0,69 > R_v^2 > 0,50$: calibración que permitiría una discriminación entre muestras de alto, medio o bajo contenido para un parámetro en cuestión.

Tabla 4.3 Estadísticos de calibración y validación cruzada NIRS para la predicción de fenoles totales, según tratamiento matemático.

FENOLES TOTALES	Calibración		Validación		Grado de calibración
	R^2_c	SEC	R^2_v	SECV	
Tratamiento matemático					
SNV	0,80	4,58	0,73	5,43	Bueno
SNV sin outliers	0,81	4,55	0,74	5,39	Bueno
SNV1d,1,1	0,80	4,61	0,70	5,73	Bueno
SNV1d,1,1 sin outliers	0,87	3,82	0,76	5,08	Bueno
MSC1d,1,1	0,80	4,61	0,72	5,51	Bueno
MSC1d,1,1 sin outliers	0,87	3,85	0,77	5,13	Bueno
1d,1,1	0,80	4,57	0,71	5,61	Bueno
1d,1,1 sin outliers	0,69	5,19	0,64	5,76	Regular
2d,1,1	0,60	6,48	0,45	7,75	Malo
2d,1,1 sin outliers	0,84	4,13	0,69	5,95	Regular
SNV1d,6,6	0,81	4,45	0,76	5,04	Bueno
SNV1d,6,6 sin outliers	0,76	4,61	0,72	5,22	Bueno

R^2_c y R^2_v : Coeficiente de determinación de calibración y validación cruzada, respectivamente; SEC y SECV: Error estándar de calibración y de validación cruzada, respectivamente; SNV: Standard normal variate; d: Grado de derivación; MSC: Espectro multiplicativo de la dispersión; 1,1 /6,6: Eliminación de 1 y 6 valores de longitudes de onda, respectivamente a cada lado del espectro

Primeramente, cabe destacar que los datos espectrales muestran una buena correlación con los resultados de referencia del laboratorio para todos los tratamientos utilizados. Las peores correlaciones se obtienen aplicando tratamientos de derivación Savitzky – Golay, siendo la R^2_c más baja de 0,60 con un error de calibración de 6,48. Así como, la R^2_v menor de 0,45 con su respectivo error de validación cruzada de 7,75. Ambos datos fueron obtenidos con el tratamiento derivativo Savitzky-Golay de segundo orden. Sin embargo, eliminando los outliers se mejora en gran medida la regresión alcanzando $R^2_c = 0,84$ y $R^2_v = 0,69$. Una vez eliminados las muestras atípicas (outliers) las correlaciones más bajas se logran aplicando Savitzky–Golay de primer orden a los datos espectrales con $R^2_c=0,69$ y $R^2_v = 0,64$, que de acuerdo a los criterios interpretativos de los modelos de (Shenk, 1986) permitiría una adecuada discriminación entre muestras de contenido alto, medio y bajo en fenoles totales.

Se puede apreciar una efectividad mayor a la hora de aplicar tratamientos de normal estándar variate (SNV) o de corrección del efecto multiplicativo (MSC) con una $R^2_c = 0,81$ para el primero y de $R^2_c = 0,87$ para el segundo tratamiento. Las R^2_v fueron de 0,74

y 0,77 respectivamente dichos estadísticos que reflejan ecuaciones de calibración NIRS muy sólidas.

Los números de correlación más próximos a 1, así como los errores de calibración y validación cruzada más bajos se obtuvieron combinando dos tratamientos matemáticos. En primer lugar, se aplicó un SNV sobre los datos espectrales, y, posteriormente, una derivada Savitzky-Golay de primer orden eliminando 1 dato espectral por el lado izquierdo y otro por el lado derecho del espectro (SNV1d,1,1) obteniéndose una $R^2_c = 0,87$ con un SEC = 3,82 y una $R^2_v = 0,76$ con un SECV = 5,08 (estos datos se recogen en la **Tabla 4.6**, donde se muestra el tratamiento elegido para cada parámetro).

Tabla 4.4 Estadísticos de calibración y validación cruzada para la determinación de taninos condensados, según tratamiento matemático.

TANINOS CONDENSADOS	Calibración		Validación		Grado de calibración	
	Tratamiento matemático	R^2_c	SEC	R^2_v		SECV
SNV		0,67	10,08	0,54	11,86	Regular
SNV sin out		0,65	10,56	0,53	12,40	Regular
SNV1d,1,1		0,59	11,30	0,49	12,66	Malo
SNV1d,1,1 sin out		0,56	11,83	0,47	13,09	Malo
MSC1d,1,1		0,58	11,40	0,49	12,74	Malo
MSC1d,1,1 sin out		0,55	12,00	0,49	13,17	Malo
1d,1,1		0,59	11,19	0,50	12,56	Regular
1d,1,1 sin out		0,59	11,24	0,49	12,71	Malo
2d,1,1		0,57	11,51	0,30	14,62	Malo
2d,1,1 sin out		0,79	8,19	0,55	12,65	Regular
2d,6,6		0,58	11,35	0,48	12,92	Malo
2d,6,6 sin out		0,52	12,26	0,46	13,29	Malo

R^2_c y R^2_v : Coeficiente de determinación de calibración y validación cruzada, respectivamente; SEC y SECV: Error estándar de calibración y de validación cruzada, respectivamente; SNV: Standard normal variate; d: Grado de derivación; MSC: Espectro multiplicativo de la dispersión; 1,1 /6,6: Eliminación de 1 y 6 valores de longitud de onda, respectivamente a cada lado del espectro

En cuanto a los niveles de correlación en taninos condensados, (**Tabla 4.4**) son, en líneas generales, peores que en fenoles totales, pero siguen siendo aceptables permitiendo adecuadas discriminaciones entre muestras de alto, medio y bajo contenido en taninos condensados con los modelos elegidos. En esta ocasión se observan unos grados de correlación muy similares para todos los tratamientos usados. Es destácale

que al eliminar las muestras valores aberrantes y aplicar el tratamiento SNV la R^2_c desciende levemente (R^2_c con outliers = 0,67 y R^2_c sin outliers = 0,65), probablemente debido a que se reduce el rango de concentración, por eliminar muestras con concentraciones extremas. El otro hecho más relevante de estos datos es, sin duda, al igual que en fenoles totales, la gran mejora en la correlación experimentada al eliminar los valores extremos para el tratamiento de segunda derivada Savitzky–Golay. Esto, lo convierte en el tratamiento escogido para reducir el ruido espectral para el parámetro de taninos condensados. La $R^2_c = 0,79$ con un SEC = 8,19 y la $R^2_v = 0,55$ con SECV = 12,65. Sin embargo, aplicando la segunda derivada Savitzky–Golay, si se eliminan 6 datos espectrales a cada lado del espectro se reduce en gran medida la correlación y aumentan los errores de calibración y validación cruzada, aún más tras eliminar los respectivos outliers. Posiblemente por eliminar zonas espectrales con información importante para este parámetro.

Tabla 4.5 Estadísticos de calibración y validación cruzada para la determinación de capacidad antioxidante, según tratamiento matemático.

CAPACIDAD ANTIOXIDANTE	Calibración		Validación		Grado de calibración
	R^2_c	SEC	R^2_v	SECV	
SNV	0,22	425,17	0,09	468,63	Malo
SNV sin out	0,27	426,18	0,07	486,28	Malo
SNV1d,1,1	0,34	391,80	0,15	450,62	Malo
SNV1d,1,1 sin out	0,53	338,28	0,19	459,63	Malo
MSC1d,1,1	0,32	396,40	0,16	449,58	Malo
MSC1d,1,1 sin out	0,45	363,14	0,20	448,34	Malo
1d,1,1	0,39	377,61	0,17	444,61	Malo
1d,1,1 sin out	0,43	372,15	0,16	462,35	Malo
2d,1,1	0,31	401,12	0,04	477,07	Malo
2d,1,1 sin out	0,46	263,45	0,14	322,19	Malo
SNV1d,6,6	0,20	431,53	0,09	466,39	Malo
SNV1d,6,6 sin out	0,17	450,98	0,11	476,24	Malo

R^2_c y R^2_v : Coeficiente de determinación de calibración y validación cruzada, respectivamente; SEC y SECV: Error estándar de calibración y de validación cruzada, respectivamente; SNV: Standard normal variate; d: Grado de derivación; MSC: Espectro multiplicativo de la dispersión; 1,1 /6,6: Eliminación de 1 y 6 valores de longitud de onda, respectivamente a cada lado del espectro

En la **Tabla 4.5** se muestran los resultados estadísticos obtenidos en los modelos NIRS desarrollados para predecir la capacidad antioxidante. Se observan unos errores de

calibración y validación muy elevados para este parámetro, así como, unos coeficientes de determinación muy bajos. El coeficiente de correlación empeora especialmente al eliminar datos del espectro (para el tratamiento SNV1d,6,6 $R^2_c = 0,16$ $R^2_v = 0,11$. El tratamiento escogido, a pesar, de obtenerse correlaciones muy bajas es el combinado de desviación normal estándar (SNV) con la primera derivada Savitzky–Golay dando como resultado una $R^2_c = 0,53$ con un SEC de 338,28 pero con un coeficiente de determinación para la validación cruzada muy bajo ($R^2_v = 0,19$) y un SECV = 459,63.

Tabla 4.6 Estadísticos de calibración y validación cruzada NIRS de los tratamientos seleccionados para la predicción de cada uno de los parámetros estudiados.

Parámetro	Tratamiento matemático utilizado	Calibración		Validación		Grado de calibración
		R^2_c	SEC	R^2_v	SECV	
Fenoles totales	SNV1d,1,1	0,87	3,82	0,76	5,08	Bueno
Taninos condensados	2d,1,1	0,79	8,19	0,55	12,65	Regular
Capacidad antioxidante	SNV1d,1,1	0,53	338,28	0,19	459,63	Malo

R^2_c y R^2_v : Coeficiente de determinación de calibración y validación cruzada, respectivamente; SEC y SECV: Error estándar de calibración y de validación cruzada, respectivamente; SNV: Standard normal variate; d: Grado de derivación; 1,1: Eliminación de 1 valor de longitud de onda a cada lado del espectro

En la **Tabla 4.6** se muestran los tratamientos que arrojan los mejores estadísticos para la predicción mediante tecnología NIRS del contenido en fenoles totales, taninos condensados y capacidad antioxidante en muestras de vegetación apetecible para la alimentación de Gochu Asturcelta.

Así pues, las mejores correlaciones entre los datos de referencia y los datos espectrales se obtuvieron para los fenoles totales aplicando un tratamiento matemático de standard normal variate combinado con una derivada primera Savitzky-Golay con R^2 , tanto de correlación como de validación cruzada muy elevados ($R^2_c = 0,87$ y $R^2_v = 0,76$) y errores de calibración y validación cruzada reducidos (SEC = 3,81 y SECV = 5,08). Así mismo, para la medición de taninos condensados se aplicó una segunda derivada

Savitzky-Golay consiguiendo una $R^2_c = 0,79$ y $R^2_v = 0,55$ y unos errores $SEC = 8,19$ y $SECV = 12,65$. Para la capacidad antioxidante se escogió, al igual que en los fenoles totales, un SNV combinado con un derivativo de primer orden. Sin embargo, en esta ocasión, no se establece una correlación sólida entre los datos de referencia y los espectrales NIR ($R^2_c = 0,53$ y $R^2_v = 0,19$), con errores más elevados que en los anteriores casos ($SEC = 338,28$ y $SECV = 459,63$), lo que no permite el uso del modelo para la predicción NIRS de este parámetro.

5. Discusión:

5.1. Datos de referencia de FT, TC y CA y correlación con los datos predichos por NIRS

Las analíticas llevadas a cabo en laboratorio para la determinación de fenoles totales se realizaron mediante la técnica de Folin-Cioaltea. Esta técnica se encuentra perfectamente estandarizada en el Compendio Internacional de análisis de vinos y mostos (2019), siendo de uso habitual en los laboratorios para analizar el contenido en fenoles en la industria alimentaria. Tiene especial relevancia en el sector vinícola. Esto permite que la técnica se haya ido perfeccionando a lo largo del tiempo y por tanto sea exacta y precisa para medir la concentración de fenoles. Lo que se traduce en una desviación estándar relativamente baja (10,24) y un coeficiente de variación de 1,17. Los datos de referencia obtenidos en el laboratorio son, por tanto, precisos y se ajustan a la medida real. En cuanto a los taninos condensados, el método de la vainillina (Sun et al., 1998) también es muy utilizado en industria alimentaria siendo relativamente sencillo de aplicar, lo que concuerda con una desviación estándar baja (17,54) y un coeficiente de variación = 1,30, mayores que en fenoles totales, pero, aun así, reducidos.

La técnica ORAC (Brescia, 2012) utilizada para medir la capacidad antioxidante entraña mayor complejidad que los dos anteriores. Por un lado, utiliza una sonda de fluorescencia (ver Material y Métodos) cuya manipulación debe ser cuidadosa para no dañarla, previamente a su utilización sobre la muestra. Por otro lado, en este caso, se trabaja con volúmenes de μ litros, lo que posibilita mayores errores relativos por imprecisiones humanas o de origen mecánico. Una tercera razón que puede explicar la gran dispersión de los datos referentes a la capacidad antioxidante de las muestras es precisamente, la gran reactividad de estos compuestos, así como su inestabilidad. Por

tanto, la manipulación de estos compuestos, así como del Trolox debe ser cuidadosa. Todo esto hace que las mediciones se vuelvan más imprecisas aumentando la desviación estándar (481,65) y el coeficiente de variación (1,49) con respecto a los fenoles y los taninos.

Uno de los objetivos fundamentales del trabajo consiste en conocer la capacidad de los equipos de espectrometría de infrarrojo cercano (NIRS) para medir con precisión las concentraciones de fenoles totales, taninos condensados y capacidad antioxidante en las muestras de vegetación apetecible para la alimentación del Gochu Asturcelta. Es por eso, que, como se detalló en la sección Material y Métodos, se intenta establecer una correlación entre los datos espectrales obtenidos con el equipo NIRS (MicroPhazir™) y las medidas obtenidas mediante métodos de referencia sobre los que se discute anteriormente. En la, se presentan los estadísticos que informan de la relación entre los errores obtenidos en el desarrollo de modelos de calibración NIRS y los correspondientes a los errores de las técnicas de laboratorio de referencia.

✓ **$R^2_{\max} = 1 - (ETL/DT)^2$** (Howard y Workman, 1991)

- ETL= error de laboratorio del método de referencia
- DT= desviación típica de la población de calibración, para el constituyente considerado

✓ **$ETP = (\sum (NIR-LAB)^2/N)^{1/2}$**

- ETP= error de predicción
- N= muestras que no hayan intervenido en la calibración

✓ **$ETP^2 = ETL^2 + ET^2_{NIR} + ET^2_{\text{modelo}}$** (Osborne et al, 1993)

- ETL= error de laboratorio del método de referencia
- ET^2_{NIR} = error del método NIRS
- ET^2_{modelo} = error del método quimiométrico utilizado en el ajuste

Fig. 5.1 Estadísticos informativos de la precisión de la técnica de referencia y del error del método NIRS. Imagen cedida por De la Roza Delgado, B.

Como puede observarse, el coeficiente de determinación (R^2), cuyo valor máximo es 1, depende en gran medida del error de laboratorio (ETL). En cuanto al error de predicción de un modelo NIRS (ETP), depende de la diferencia entre el valor NIRS predicho y el

valor de referencia o nuevamente del error del laboratorio para un parámetro determinado.

Se obtuvieron buenas correlaciones en las ecuaciones de calibración NIRS que relacionaban los datos espectrales y los obtenidos por el método de referencia (Folin-Ciocalteu) para fenoles totales. Esto, se debe a dos factores principales: por un lado, la técnica de referencia es, como decíamos anteriormente sencilla de aplicar y se encuentra estandarizada internacionalmente lo que permite una precisión importante y, por tanto, tiene un bajo error de laboratorio (ETL). Por otro lado, permite demostrar la validez de los equipos NIRS portátiles para lograr ecuaciones de calibración NIRS que presentan una elevada precisión y exactitud para el análisis in situ de muestras frescas de vegetación sin que estas requieran de ningún procesamiento previo.

Para reducir el ruido muestral generado por factores físicos como las diferencias en el tamaño de partículas (átomos y moléculas), variaciones en la densidad molecular etc. De tal manera que en los espectros tan solo se muestren las variaciones de reflectancia debidas a la diferente absorbancia de los compuestos químicos de cada muestra para cada longitud de onda y mejorar, de esta forma la correlación, se decidió aplicar un tratamiento de standard normal variate (SNV) combinado con una derivada primera Savitzky-Golay obteniéndose elevados coeficientes de determinación, tanto para calibración, como para validación cruzada ($R^2_c = 0,87$ y una $R^2_v = 0,76$).

Las correlaciones obtenidas para los taninos condensados fueron levemente más bajas pero aceptables, esto puede deberse al mayor error de laboratorio del ensayo, ya que precisa de un número más elevado de factores a controlar que en la técnica anterior. A modo de ejemplo, si la medición no se realiza a una temperatura óptima de 25°C a 30°C (Sun et al., 1998), la absorbancia de los taninos es menor y por lo tanto, se obtienen datos, menores a la concentración real. La absorbancia está influida, también por otros factores como el tiempo de reacción entre los taninos y la vainillina (reactivo que les otorga un pico de absorbancia a 500 nm), así como por la acidez del medio (para controlarla se añade H_2SO_4).

A pesar de esto, el método de la vainillina que se utilizó se encuentra estandarizado y resulta relativamente sencillo y fiable, es por eso que las correlaciones continúan siendo aceptables. Tras aplicar un tratamiento derivativo de segundo orden a los espectros y eliminar los outliers correspondientes se lograron $R^2_c = 0,79$ y una $R^2_v = 0,55$. Se

demuestra de esta forma que el equipo portátil MicroPhazir™ también puede medir con eficacia la concentración de estos compuestos en muestras de vegetación sin que estas reciban tratamiento previo.

Sin embargo, para la capacidad antioxidante, tan solo se obtiene un coeficiente $R_c^2 = 0,52$ y $R_v^2 = 0,19$. Esta falta de correlación está directamente relacionada con un elevado error de laboratorio para esta técnica existiendo evidencias del importante error en las mediciones de referencia mediante la técnica ORAC, puesto que, los datos de referencia presentan una desviación típica muy elevada lo que indica la existencia de gran dispersión entre unas muestras y otras. Si se observan los datos de referencia de capacidad antioxidante para cada muestra presentes en el Anexo I existen mediciones muy variables (como por ejemplo $57,63 \mu\text{ET}/\text{g}_{\text{ps}}$ en una muestra de gramíneas y $2227,26 \mu\text{ET}/\text{g}_{\text{ps}}$ en hojas de arándano) para muestras con composición vegetal similar. Por tanto, la baja correlación encontrada para este tercer parámetro se justifica en gran medida por errores de tipo humano ajenos a la tecnología de espectrometría de infrarrojo cercano y por otro lado puede influir la gran dispersión en las concentraciones de CA en la población utilizada para el desarrollo del modelo de calibración, pero probablemente con poca representatividad en algunas concentraciones.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos para los tres parámetros estudiados (fenoles totales, taninos condensados y capacidad antioxidante) se consigue demostrar la viabilidad de los equipos NIRS portátiles para realizar mediciones in situ de la composición química de muestras vegetales en fresco. Esto abre un amplio campo de posibilidades, ya que permite realizar mediciones en el lugar de muestreo llevando el laboratorio a la muestra y no la muestra al laboratorio, evitando, de esta forma, el deterioro mecánico de las muestras durante el transporte, así como, la pérdida de humedad en el tiempo transcurrido desde la toma de la muestra hasta la correspondiente medición. Por tanto, permite una mayor autonomía al analizar la composición química de muestras delicadas o inestables, mayor precisión a la hora de estudiar químicamente muestras orgánicas vivas y un incremento de la capacidad de muestreo en lugares aislados (sistemas montañosos de gran elevación, fondos marinos etc.).

5.2. Variaciones en las medidas de referencia de FT, TC y CA en función del origen vegetal

Una segunda parte del estudio comparó los contenidos en fenoles totales, taninos condensados y capacidad antioxidante de las diferentes muestras recogidas en función de su lugar de origen.

Han sido ampliamente estudiados los compuestos antioxidantes presentes en las partes verdes de múltiples especies de árboles caducifolios tales como: *Castanea sativa* (castaño), *Quercus robur* (roble común), *Betula celtibérica* (abedul) (Nebehaj y Hofmann, 2015). Otro hecho muy contrastado consiste en la rápida pérdida de los compuestos antioxidantes en las partes verdes vegetales tras ser separados de la planta (Ninfali et al., 2005; Fuente Maqueda, 2018) de esta manera, y a pesar de que se han mantenido las muestras bajo refrigeración constante los valores obtenidos mediante los análisis bromatológicos mediante NIRS, así como en los respectivos métodos de referencia, evidencian valores netamente menores a los que realmente son ingeridos por el cerdo in situ en el campo.

Cabe decir que los compuestos fenólicos tienen múltiples funciones en las especies vegetales (Fuente Maqueda, 2018). Los fenoles, y otros compuestos antioxidantes conforman un mecanismo de defensa muy común en plantas superiores frente al estrés luminoso. Una fracción importante (aproximadamente el 4 %) de la radiación que llega a la superficie terrestre procedente del sol lo hace en el espectro del ultravioleta promoviendo la formación de radicales libres de oxígeno extremadamente reactivos (Sharma et al., 2012). Sin embargo, los compuestos antioxidantes inhiben el proceso protegiendo a las células vegetales.

Una parte importante de los árboles angiospermas, son polinizados por insectos. Estos compuestos antioxidantes, como taninos o polifenoles tienen un papel fundamental en la atracción de insectos polinizadores, el castaño (*Castanea sativa*) es un buen ejemplo de esto. Por eso, es lógico pensar que su contenido en las partes verdes de las plantas debe ser elevado.

Además, la presencia elevada de taninos condensados en las hojas es un eficaz mecanismo de defensa frente al ataque de los seres vivos superiores, ya que otorgan un

fuerte sabor astringente siendo también protectores frente a hongos, bacterias y otros microorganismos parasitarios (Scalbert, 1991).

En nuestro estudio, se repite un patrón similar para fenoles, taninos y en las medidas de capacidad antioxidante siendo más elevadas para muestras obtenidas en aéreas de bosque que para muestras de pastizal. Especialmente elevados son los valores encontrados en las hojas de especies caducifolias como el roble, castaño o abedul. Estas especies sintetizan ácido ascórbico que se almacena en las hojas, sirviendo como sensor para iniciar el proceso de senescencia de la hoja bien por múltiples tipos de estrés ambiental, como la sequía, temperaturas extremas o por llegada del otoño y caída natural de las hojas (Barth et al., 2006).

Estos son las principales funciones de los compuestos antioxidantes en plantas superiores, como se puede apreciar, son funciones clave en el desarrollo y la supervivencia de las plantas por lo que es lógico pensar que su concentración en las especies vegetales debe ser elevada.

Apreciamos, sin embargo, una tendencia similar para los tres paramos estudiados, existiendo una concentración mayor de compuestos antioxidantes en las muestras foliares arbóreas, por el contrario, los niveles en vegetación herbácea presente en zonas de prado abierto son claramente inferiores (ver **Fig. 4.1** , **Fig. 4.2** y **Fig. 4.3**). Tal y como se indica en el apartado de Resultados, los fenoles totales son más elevados en las muestras foliares de abedul, arándano, roble y *Erica arborea*, en comparación con las plantas herbáceas como gramíneas o leguminosas etc. La situación es similar en el caso de los taninos condensados donde se encuentran concentraciones especialmente elevadas para hojas de abedul, roble y de *Erica arborea*. En cuanto a la capacidad antioxidante, debido a la gran dispersión de los datos no se aprecian diferencias significativas entre los datos de unas especies u otras. Sin embargo, si se aprecian valores promedio más elevados en las muestras foliares que en las herbáceas. Los vegetales de porte leñoso y de mayor tamaño como pueden ser las especies caducifolias que nos encontramos en un monte de castaño bajo tienen mayor capacidad para sintetizar estos compuestos debido a que sus rutas hormonales se encuentran más desarrolladas y disponen de una gran cantidad de recursos (fotosíntesis). Además, su porte leñoso lignificado les otorga una protección frente a organismos patógenos, radiaciones nocivas y evita la transpiración etc., es por eso, que estos vegetales pueden

centrar sus recursos en proteger el área foliar. Esto incluye la síntesis y concentración de estos compuestos. Mientras tanto, en las plantas herbáceas los recursos disponibles son más limitados y el área vulnerable expuesta al exterior es, en proporción mucho mayor. Es por eso que la capacidad de estas plantas para sintetizar compuestos antioxidantes es menor, lo que explicaría las diferencias en su concentración con respecto a los medidos en muestras foliares de árboles.

Así mismo, se analizaron muestras de vegetación presente en el sotobosque (estratos inferiores al arbóreo) observándose concentraciones de antioxidantes muy variables entre las distintas muestras, esto puede explicarse si tenemos en cuenta que parte de las especies que habitan en esta zona de sotobosque serán las mismas que las que podemos encontrar en zonas abiertas, pero, por otro lado, también encontramos hojas de árboles caídas recientemente (cuyos contenidos en polifenoles, taninos etc. aún son elevados).

Por estos motivos encontramos muy beneficiosa la cría del Gochu Asturcelta en monte de castaño bajo en régimen extensivo, ya que la ingesta elevada de fenoles, taninos y demás compuestos antioxidantes genera un aumento de estos en la carne del cerdo. Los beneficios que estos compuestos tienen sobre la salud humana han sido ampliamente estudiados por la comunidad científica. Algunos de ellos se detallan en el apartado de (Introducción). La cría del Gochu Asturcelta en intensivo supone un estrés para el animal. Esta raza es muy rustica y se encuentra adaptada al bosque caducifolio oceánico que ocupa gran parte de la geografía asturiana (como se ha dicho en el apartado 1.3.1. titulado: “Aprovechamiento de los recursos forestales por el ganado porcino del tronco celta: Gochu Asturcelta”, presente en la Introducción de este trabajo). Adicionalmente, la cría en intensivo o semiextensivo disminuye la ingesta de compuestos antioxidantes, ya que los frutos y hojas de castaño, roble o abedul (muy ricos en antioxidantes) no formarían parte de la dieta del cerdo.

Otra ventaja de la hipotética cría de Gochu Asturcelta en extensivo es la labor de limpieza de los montes que podrían desempeñar estos animales, disminuyendo el riesgo de incendios en la región. También valoramos esta, como una actividad que suponga un incentivo económico para las zonas rurales de Asturias, que, en la actualidad sufren un grave problema de despoblación (López Fernández, 2016).

6. Conclusiones:

1. Las desviaciones entre los resultados de las predicciones NIRS de fenoles totales y de taninos condensados frente a los obtenidos por los métodos de referencia estandarizados, demuestran la capacidad de esta tecnología para cuantificar con precisión diferentes compuestos químicos de muestras de vegetación.
2. El equipo NIRS portátil MicroPhazirTM ha demostrado una elevada capacidad para su uso en el análisis in-situ, en muestras sólidas de vegetación, sin requerir procesado.
3. El lugar de origen de la vegetación provoca variaciones en las concentraciones de fenoles totales, taninos condensados, teniendo y capacidad antioxidante de la flora vascular. Las hojas de especies arbóreas y arbustivas contienen una concentración elevada de fenoles y taninos, mientras que las especies herbáceas de pastizales abiertos (ciertas especies de gramíneas o leguminosas) tienen un menor poder antioxidante.
4. La alimentación del Gochu Asturcelta en un hábitat de monte de castaño bajo incrementaría la ingesta de antioxidantes, lo que podría mejorar el sabor y textura de la carne producida.
5. La cría de Gochu Asturcelta en áreas rurales de monte puede suponer un motor económico para la zona rural asturiana generando puestos de trabajo y generando riqueza a la región.

7. Bibliografía:

7.2. Artículos científicos y libros:

Abdi H. (2010). “Coefficient of variation”. Encyclopedia of Research Desing. Vol. 1 pp. 169-171.

Adepipe, O. E., Johanningsmeier, S. D., Truong, V. y Yencho, G.C. (2016). “Development and Validation of a Near-Infrared Spectroscopy Method for the Prediction of Acrylamide Content in French-Fried Potato”. Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol. 64 pp. 1850-1860.

Ainsworth, E. A. y Gillespie, K. M. (2007). “Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent”. Nature Publishing Group. Vol. 2. pp. 875-877.

Alomar, D. y Fuchslocher, R. (1998). “Fundamentos de la espectroscopia de reflectancia en el infrarrojo cercano NIRS como método de análisis de forrajes”. Agro Sur. Vol. 26. pp. 88-104.

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”. International Society for Animal Genetics. Vol. 34. pp. 319-324.

[Libro] Aparicio Sánchez, G. (1944). “Evolución fundamental de las agrupaciones porcinas españolas”. Zootecnia especial. Etnología Compendiada. Córdoba. Editorial Sev Córdoba.

[Libro] Argumentaría Gutiérrez, A., De la Roza Delgado, B., Cueto Ardavín, M.A., Hidalgo Ordoñez, C. O., Tamargo Miguel, Carolina., Rodríguez Pérez, Aida., Fernández García, A., Merinos Hernantes, M.J., Menéndez Fernández, J. (2012) “Manual del Gochu Asturcelta” en Argumentaría Gutiérrez, A. en “La raza porcina de Asturias: El Gochu Asturcelta” pp. 15-28, Menéndez Fernández, J. en “La asociación de criadores del Gochu Asturcelta” pp. 29-34 y Argumentaría Gutiérrez, A. y Menéndez Fernández J. en “La recuperación del Gochu Asturcelta” pp. 35-46. Editorial SERIDA. Oviedo. Asturias

[Tesis doctoral] Arias Fernández, M. (2015). “Modelización del monte bajo de castaño de Brañalonga (Tineo) mediante tecnología LiDAR”. Máster en Teledetección y sistemas de información geográfica. Universidad de Oviedo. Mieres.

Baizán, S., Vicente, F., Barhoumi, N., Feito, I., Rodríguez, L. y Martínez Fernández, A. (2018). “Efecto de la inclusión de ensilado de haba forrajera en la dieta de vacuno lechero sobre la ingestión voluntaria y la producción y composición de la leche”. ITEA. Vol. 114. pp. 353-367.

Barnes, R. J., Dhanoa, M. S. y Lister, S. J. (1989) "Standard Normal Variate Transformation and De-trending of Near-Infrared Diffuse Reflectance Spectra". Society for Applied Spectroscopy. Vol. 43. pp. 772-777.

Barnes, R. J., Dhanoa, M. S. y Lister, S. J. (1993). “Correction of the description of standard normal variate (SnV) and detrend (dt) transformation in Practical Spectroscopy With Applications In Food And Beverage Analysis.”. Journal of Near infrared Spectroscopy. Vol. 1 pp. 185-186.

Barth, C., De Tullio, M. y Conklin, P. (2006). “The role of the ascorbic acid in the control of flowering time and the onset of senescence”. Journal of Experimental Botany. Vol. 57 pp. 1657-1665.

Bartlett, M.S. (1937). "Properties of sufficiency and statistical tests". Proceedings of the Royal Society of London. Vol. 160. pp. 268-282

Bittner, L. K., Schönbichler, A., Günther, A., Bonn, K. y Huck, C. W. (2013). "Near Infrared Spectroscopy (NIRS) as a Tool to Analyze Phenolic Compounds in Plants". Current Analytical Chemistry. Vol. 9. pp. 417-423.

Brescia, P. J. (2012). "Determination of Antioxidant potential using an Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) Assay with Synergy". BioTek Instruments, Inc.

BOE nº. 21 de 24 de enero de 2007. Orden APA/53/2007, de 17 de enero, por la que se modifica el Catálogo Oficial de Razas de Ganado de España, contenido en el anexo del Real Decreto 1682/1997, de 7 de noviembre, por el que se actualiza el Catálogo Oficial de Razas de Ganado de España.

[Libro] Buxadé, C. (1984). "Ganado porcino" en Buxadé, C. "Las razas porcinas autóctonas españolas". pp. 67-88. Editorial Mundi Prensa. Madrid. España

Campo, L. y Moreno González, J. (2014). "Ecuaciones NIR desarrolladas para la estimación del contenido de proteína y almidón en el grano de maíz". Pastos y política agraria común 2014-2020. pp. 365 – 372.

Chen, H., Song, Q., Tang, G., Feng, Q. y Lin, L. (2013). "The Combined Optimization of Savitzky-Golay Smoothing and Multiplicative Scatter Correction for FT-NIR PLS Models". ISNR Spectroscopy. Vol. 2013. pp. 1-10.

[Libro] Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis (2019). International Organization of Vine and Wine. Vol. 1. International organization of Vine and Wine.

Daszykowsky, M., Kaczmarek, K., Vander Heyden, Y. y Walczak, B. (2007). "Robust statistics in data analysis - A review Basic concepts". Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems. Vol. 85. pp. 203-219.

De la Roza Delgado, B., Feito Diaz, I., Modroño Lozano, S., Piñeiro Sierra, I. y Argamentaría Gutierrez, A. (2017). "Calidad diferenciada de la carne de Gochu Asturcelta en régimen extensivo." *Tecnología agroalimentaria: Boletín informativo del SERIDA*. Vol. 19. pp. 23-28.

De la Roza Delgado, B., Ciordia Ara, M. y Argamentaría Gutierrez, A. (2018). "Producción extensiva del porcino del tronco celta en el castañar: una asociación sostenible". *Información técnica* pp. 8. CASTACELTA, Fundación Biodiversidad. Disponible on line: castacelta.serida.org

Dhanoa, M. S., Lister, S. J., Sanderson, R. y Barnes, R. J. (1994). "The link between Multiplicative Scatter Correction (MSC) and Standard Normal Variate (SNV) transformations of NIR spectra". *Journal of Near Infrared Spectroscopy*. Vol. 2. pp. 43-47.

Díaz, G., Escobar, W. y Pizarro, E. (2013). "Estrés oxidativo. Cuando el equilibrio se pierde". *Revista Motricidad y Persona*. Vol. 13. pp. 45-60.

Fearn, T., Riccioli, C., Garrido Varo, A. y Gerrero Ginel, J. E. (2009). "On the geometry of SNV and MSC". *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. Vol. 96. pp. 22-26.

Frantz, L. A., Schraiber, J. G., Madsen, O., Megens, H. J., Cagan, A., Bosse, M., Paudel, Y., Crooijmans, R., Larson, G. y Groenen, M. (2015). "Evidence of long-term gene flow and selection during domestication from analyses of Eurasian wild and domestic pig genomes". *Nature Genetics*. Vol. 47. pp. 1141-1149.

[Tesis doctoral] Fuente Maqueda J. F. (2018). "Fenoles en *Castanea sativa* Mill.: desde el monte a la industria". Universidad de Oviedo. Oviedo.

Geladi, P., MacDougall, D. y Martens, H. (1985). "Linearization and Scatter-Correction foe Near-Infrared Spectra of Meat". *OSA Publishing*. Vol. 39. pp. 491-500.

Grassi, S. y Alamprese, C. (2018). “Advances in NIR spectroscopy applied to Process Analytical Technology in food industries”. Near infrared spectroscopy (NIRS) applied to Process Analytical Technology (PAT) in food industries. Vol. 22. pp. 17-21.

Groenewald, T. (2006). “Espectroscopia de Infrarrojocercano (NIR)-La técnica de análisis rápidos del futuro”. Community of international Busines Related to Animal Production. Revista on-line http://www.engormix.com/s_articles_view.asp?art=577&AREA=AV [Visitado el 14 de abril de 2019]

[Libro] Herschel, W. “Investigation of the powers of the prismatic colors 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. Londres. Reino Unido.

Jasinska, K. y Kurek, M. A. (2017). “The effect of oil plants supplementation in pig diet on quality and nutritive value of pork meat”. European union regional development fund (Project BIOFOOD). pp. 137-146.

Jolliffe, I. T. y Cadima, J. (2016). “Principal component analysis: a review and recent developments”. The royal society publishing. Artículo 374.

Landau, S., Glasser, T., Muklada, H., Dvash, L., Perevolotsky, A., Ungar, E. D. y Walker, J. W. (2005). “Fecal NIRS prediction of dietary protein percentage and in vitro dry matter digestibility in diets ingested by goats in Mediterranean scrubland”. Small rummiant research. Vol. 59. pp. 251-263.

Larson, G. y Fuller, D. Q. (2014). “The evolution of animal domestication”. The Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics. Vol. 45. pp. 115-136.

[Trabajo Máster] Llano Suarez, P. (2016). “Desarrollo y validación de modelos quimio métricos cuantitativos para la predicción del perfil de ácidos grasos en leche (Máster en ciencias analíticas y bioanalíticas)”. Universidad de Oviedo. Oviedo.

Lobón, S., Álvarez Rodríguez, J., Blanco, M, Sanz, A. y Joy, M. (2018). “Interés de la inclusión de taninos condensados en la alimentación del ovino de carne”. Universidad de Lérida y Centro de Investigación Tecnológica de Aragón.

[Tesis doctoral] López Bautista (2001). “Curvas de calibración y validación por espectroscopia en el infrarrojo cercano (EIC) para leches fluidas”. Zamorano Carrera de Agroindustria. Honduras.

López Fernández, B. (2016). “Poblamiento y declive demográfico en Asturias, 2000-2014”. Universidad de Oviedo. Oviedo.

[Libro] Lorenzo Rodríguez, J. M., Fernández Rodríguez, M., Franco Ruíz, D., García Calvo, L., Purriños Pérez, L., Gómez Vázquez, M., Domínguez Valencia, R., Bermúdez Piedra, R., Bragado García, C. y García Corral, A. (2012). “Manual del Cerdo Celta”. Editorial. CETECA. Galicia. España

Mac Dicken, K. G., Sola, P., Hall, J. E., Sabogal, C., Tadoum, M. y Wasseige, C. (2015). “Global progress toward sustainable forest management”. *Forest ecology and management*. Vol. 352. pp. 47-56.

Manley, M y Baeten, V. (2018). “Spectroscopic Technique: Near infrared (NIR) Spectroscopy”. *Modern Techniques for food authentication*. Capítulo 3. pp. 51-101.

Martens, H., Jensen, S. A. y Geladi, P. (1983). “Multivariate linearity transformation for near-infrared reflectance spectrometry. In *Proceedings of the Nordic symposium on applied statistics*”. Stokkand Forlag Publishers. Vol. 4. pp. 205.234.

[Tesis doctoral] Menéndez Fernández, J. (2018). “Estructura genética de la raza porcina Gochu Asturcelta”. Universidad de Zaragoza. Departamento de Producción Animal y Ciencia de la Alimentos. Zaragoza.

Nebehaj, E. y Hofmann, T. (2015). “The leaf polyphenols of forest trees: optimization of the extraction solvent, seasonal changes, and structural elucidation by HPLC-ESI-MSⁿ.”. 42^o International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques.

Ninfali, P., Mea, G., Giorgini, S., Rocchi, M. y Bacchiocca, M. (2005). “Antioxidant capacity of vegetables, spices and dressings relevant to nutrition”. *British Journal of Nutrition*. Vol. 93. pp. 257-266.

Niño Medina, G., Muy Rangel D. y Urias Orona, V. (2016). “Chickpea (*Cicer arietinum*) and Soybean (*Glycine max*) Hulls: Byproducts with Potential Use as a Source of High Value-Added Food Products”. *Waste Biomass Valor*. Vol. 8. pp. 1199-1203.

Pasikatan, M. C., Steele, J. L., Spillman, C. K. y Haque, E. (2001). “Near infrared reflectance spectroscopy for online particle size analysis of powders and ground materials”. *Journal of Infrared Spectroscopy*. Vol. 9. pp. 153-164.

Pasquini, C. (2003). “Near Infrared Spectroscopy: fundamentals, practical aspects and analytical applications”. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. Vol. 14. pp. 198-219.

Patel, M., Shah, M. y Dave, J. (2016). “Near Infrared Spectroscopy in industries: A Review on research contribution”. *International Journal of Advance Engineering and Research Development*. Vol. 3. pp. 174-183.

[Trabajo Máster] Picó Moya, T. (2016). “Caracterización bromatológica de los frutos del castañar construcción de bibliotecas espectrales en el infrarrojo cercano y desarrollo de modelos de predicción”. Universidad de Oviedo. Oviedo.

Pieszka M., Szczurek, P., Bederska Lojewska, D., Migdal, W., Pieszka, M., Gogol, P. y Jagusiak, W. (2017). "The effect of dietary supplementation with dried fruit and vegetable pomaces on production parameters and meat quality in fattening pigs". *Meat science*. Vol. 126. pp. 1-10.

Pogorzelska Nowicka, E., Atanasov, A. G., Horbanczuk, J. y Wierzbicka, A. (2018). "Bioactive Compounds in Functional Meat Products". *Molecules*. Vol. 23. Artículo 307.

Porep, J., Kammener, D. R. y Carle, R. (2015). "On-line application of near infrared (NIR) spectroscopy in food production". *Trends in Food Science and Technology*. Vol. 46. pp. 211-230.

Rinnan, A., Van den Berg, F. y Engelsen, S. B. (2009). "Review of the most common pre-processing techniques for near-infrared spectra". *Trends in Analytical Chemistry*. Vol. 28. pp. 1201-1222.

Roggo, Y., Chalus, P., Maurer, L., Lema Martinez, C., Edmond, A. y Jent, N. (2007). "A review of near infrared spectroscopy and chemometrics in pharmaceutical technologies". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. Vol. 44. pp. 683-700.

[Tesis doctoral] Romero Gamenro, M. A. (2002). *Desarrollo de nuevas metodologías analíticas en el control de calidad de la industria farmacéutica*. Universidad Autónoma de Barcelona.

[Libro] Royo, L. J., Álvarez, I., Fernández, I., Pérez Pardal, L., Álvarez Sevilla, J., Santos e Silva, J., Godinho, R., Ferrand, N. y Goyache, F. (2008). "Proceedings of the 6th International Symposium on the Mediterranean Pig". Messina. Italia.

Sánchez, L., González Carril, J. A. y Otero, M. (2000). "Caracterización Etnológica del Cerdo Celta". *Redalyc. Archivos de Zootecnia*. Vol. 49. pp. 175-177.

Santos, C., Páscoa y R., Lopes, J. A. (2013). "A Review on the Applications of Portable Near-Infrared Spectrometers in the Agro-Food Industry". *Applied Spectroscopy*. Vol. 67. pp. 1215-1233.

Sanz, M., Cadahía, E., Esteruelas, E., Muñoz, A. M., Fernández de Simón, B., Hernández, T. Estrella, I. (2010). "Phenolic Compounds in Chestnut (*Castanea sativa* Mill.) Heartwood. Effect of Toasting at Cooperage". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 58. pp. 9631-9640.

Scalbert, A. (1991). "Antimicrobial properties of Tanins". *Phytochemistry*. Vol. 30. pp. 3875-3883.

Sharma, P., Jha, A. B., Dubey, R. S. y Pessarakli, M. (2012) "Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions". *Journal of Botany*. Vol. 2012. pp. 1-26.

Shenk, J. S. (1986). "Measurement and prediction of digestibility and energy value. Near infrared analysis of forage and feed for dairy cows. *Federation Internationale de Laiterie*."

Shenk, J. S., Workman, J. J., Westerhaus, M. O. (1992). "Application of NIR spectroscopy to agricultural products". *Handbook of Near Infrared Analysis*.

Shenk, J.S. and Westerhaus, M.O. (1995). "Routine operation, calibration, development and network system management manual". NIRSystem Inc.

Shenk, J.S. and Westerhaus, M.O. (1996) Calibration the ISI way. In *Near Infrared Spectroscopy: The Future Waves*. NIR Publications. pp. 198-202

[Libro] Siesler H. W., Ozaki, I., Kawata, S. y Heise, H. M. (2008). "Near Infrared Spectroscopy: principles, instruments, applications". Editorial Jhon Wiley & Sons. Wheinheim. Alemania.

Sun, B., Da Silva, R. J. M. y Spranger, I. (1998). "Critical Factors of Vanillin Assay for Catechins and Proanthocyanidins". *Journal of Agricultural Food Chemistry*. Vol. 46. pp. 4267-4274.

Vieira, C., Martínez, B., Fernández, A. M., Sánchez, C. I., Rubio, B. y Menéndez, J. "Gochu Asturcelta semiextensive production: carcass and meat quality and fatty acid profile.". *Options Méditerranéennes. Série A, Séminaires*. Vol. 101 pp. 487-491.

Wang, G.D., Xie, H. B., Peng, M. S., Irwin, D. y Zhang Y. P. (2014). "Domestication Genomics: Evidence from Animals". *Annual Reviews of Animal Bioscience*. Vol. 2 pp. 65-84

Wold, S., Geladi, P., Esbensen, K. y Öhman J. (1987) "Multiway Principal Components and PLS-Analysis". *Journal of Chemometrics*. Vol. 1. pp. 41-56.

Yulia, M. y Suhandy, D. (2018). "The feasibility of using explicit method for linear correction of the particle size variation using NIR Spectroscopy combined with PLS2 regression method". *Material Science and Engineering*. Vol. 334. pp. Artículo 1.

7.2. Fuentes de imágenes y tablas:

*Las imágenes no indicadas en la bibliografía son de creación propia y utilizando softwares para los que el SERIDA dispone de licencia.

Fig. 1.1 Cerdo celta gallego

https://www.google.com/search?hl=es&authuser=0&rlz=1C1AVFA_enES835ES835&biw=1366&bih=657&tbm=isch&sa=1&ei=0H6cXJ_CHsmMa_Tkt5gN&q=cerdo+celta+gallego&oq=cerdo+celta&gs_l=img.1.1.0l2j0i5i30j0i24l4.3931010.3933933..3936103...0.0..0.137.955.10j1.....1....1..gws-wiz-img.....35i39j0i67j0i8i30.oDgNVm87_zE#imgrc=RevTcCO7AI-OrM: [Visitado el 28 de marzo de 2019]

Fig. 1.2 Chato vitoriano
https://www.google.com/search?hl=es&authuser=0&rlz=1C1AVFA_enES835ES835&biw=1366&bih=657&tbm=isch&sa=1&ei=MY6cXljiMKmJlWTGmJvQAg&q=cerdo+chato+vitoriano&oq=chato+vito&gs_l=img.1.1.0j0i5i30j0i8i30.174776.177457..179572...0.0..0.174.1034.7j3.....1....1..gws-wiz-img.....35i39j0i67j0i30.jdYQ6ks5gH4#imgrc=Sv6fBldV2y6Igm: [Visitado el 28 de marzo de 2019]

Fig. 1.3 Cerdo de Baztan
https://www.google.com/search?rlz=1C1AVFA_enES835ES835&biw=1366&bih=657&tbm=isch&sa=1&ei=l4-cXPeKKemTlWSUmqz4Bg&q=cerdo+de+baztan&oq=cerdo+de+baztan&gs_l=img.3...45594.49271..49792...0.0..0.294.1321.3j5j1.....1....1..gws-wiz-img.....0j0i67j0i5i30j0i8i30.JsSXzqsS4n8#imgrc=2XpQ8PKTNw1NFM: [Visitado el 28 de marzo de 2019]

Fig. 1.4 Cerdo de Vic
https://www.google.com/search?rlz=1C1AVFA_enES835ES835&biw=1366&bih=657&tbm=isch&sa=1&ei=ZJCcXPv7BqOUlwT0jLf4Ag&q=cerdo+de++vic+catalan&oq=cerdo+de++vic+catalan&gs_l=img.3...73042.77630..78089...0.0..0.731.1828.1j7j6-1.....1....1..gws-wiz-img.....35i39j0i8i10i30j0i8i30.dxG-5cSmvrc#imgrc=vO9oaepFHUIgM: [Visitado el 28 de marzo de 2019]

Fig. 1.5 Gochu Asturcelta características anatómicas:
https://www.google.es/search?q=gochu+asturcelta&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwiJ5KqBiqLhAhVsD2MBHR7bDUMQ_AUIDigB&biw=1366&bih=657#imgrc=z8qM-dtNpLM9zM: [Visitado el 27 de marzo de 2019].

Fig. 1.6. Efecto de pastoreo de Gochu Asturcelta y regeneración posterior. Informe del proyecto de investigación RTA2014-00051-C04-00. Sostenibilidad de sistemas silvopastorales de frondosas caducifolias iberoatlánticas con razas autóctonas de cerdo en régimen extensivo Imagen cedida por Ciordia, Ara M.

Fig. 1.7 Fuente de luz <https://sp.depositphotos.com/85860160/stock-photo-turn-on-tungsten-light-bulbturn.html> [Visitado el 14 de abril de 2019].

Fig. 1.7 Colimador <https://elespectrofotometro.com/partes/> [Visitado el 14 de abril de 2019]

Fig. 1.7 Monocromador prisma <https://spanish.alibaba.com/g/spectrometer-prism.html>

[Visitado el 14 de abril de 2019]

Fig. 1.7 monocromador rendija

http://repositorio.innovacionmh.es/Proyectos/P_22CursoMateriales/Miguel_Angel_Sogorb/Wimba/Espectroscopia_04.htm [Visitado el 14 de abril de 2019]

Fig. 1.7 Detector óptico y lector digital <https://elespectrofotometro.com/partes/> [Visitado el 14 de abril de 2019]

Fig. 1.7 Sistema informático <https://tecnologia.uncomo.com/articulo/que-hacer-con-mi-ordenador-viejo-24215.html> [Visitado el 14 de abril de 2019].

Fig. 1.8 Principales tipos de interacciones de la radiación NIR al incidir sobre las moléculas. Imagen cedida por De la Roza Delgado B. (Adaptación de Shenk et al., 1992).

Fig. 3.1 Imagen aérea de las parcelas donde se realizó el estudio indicando su área respectiva y los puntos de recogida de biomasa en las parcelas Control. Informe del Proyecto de investigación RTA2014-00051-C04-00 (2016). Sostenibilidad de sistemas silvopastorales de frondosas caducifolias iberoatlánticas con razas autóctonas de cerdo en régimen extensivo.

Fig. 3.2 Muestreo de la vegetación: a la izquierda bosque, a la derecha. Prado en las parcelas control (C1, C2, C3), empleando 5 cuadrados/parcela de 2 x 2 m. Informe del proyecto de investigación RTA2014-00051-C04-00 (2016). Sostenibilidad de sistemas silvopastorales de frondosas caducifolias iberoatlánticas con razas autóctonas de cerdo en régimen extensivo. Imágenes cedidas por Ciordia Ara, M.

Fig. 3.3 División de las muestras en vegetación apetecible, vegetación no apetecible y materia muerta. Imágenes cedidas por Ciordia Ara, M.

Fig. 3.4 Medición de muestra de vegetación apetecible con equipo portátil MicroPhazirTM. Informe del proyecto de investigación RTA2014-00051-C04-00 Sostenibilidad de sistemas silvopastorales de frondosas caducifolias iberoatlánticas con razas autóctonas de cerdo en régimen extensivo

Fig. 3.5 Equipo portátil MicroPhazirTM. Imagen propia

Fig. 3.6 Espectro resultante de la medición en una muestra de vegetación apetecible para el Gochu Asturcelta. Imagen propia modificada

Fig. 3.7 Curvas patrón de Trolox (Brescia, 2012)

Fig. 5.1 Estadísticos informativos de la precisión de la técnica de referencia y del error del método NIRS. Imagen cedida por De la Roza Delgado, B.

ANEXO I

ID Muestras	Descripción	FT (mgEAG/gps)	TC (mg EC/gps)	CA (μ mol ET/gps)
I16-20485	Erica arborea	22,62	55,74	2760,97
I18-22399	Erica arborea	22,49	48,36	
I18-22400	Erica arborea	22,14	39,89	549,31
I18-22401	Erica arborea	14,78	35,57	407,65
I16-20466	Gramineas	0,51	2,01	43,91
I16-20469	Gramineas	0,63	4,37	101,75
I16-20491	Gramineas	0,76	2,45	99
Tan/Gram I17-21284	Gramineas	1,01	2,72	73,06
I17-21344	Gramineas	0,65	2,07	136,35
I18-22370	Gramineas	0,13	1,4	35,75
I16-20471	Gramineas	0,99	2,53	118,76
I16-20492	Gramineas	0,75	3,89	73,12
I16-20493	Gramineas	0,87	4,31	126,64
I18-22375	Gramineas	0,65	2,4	57,63
I18-22380	Gramineas	0,69	2,64	67,82
I18-22382	Gramineas	0,84	4,09	67,93
I17-21364	Hojas abedul	15,14	62,72	1068,13
I16-20509	Hojas abedul	16,63	85,56	257,6
I18-22396	Hojas abedul	5,11	9,05	140,03
I18-22397	Hojas abedul	5,1	11,83	141,88
I18-22398	Hojas abedul	9,6	30,91	233,79
I16-20511	Hojas arándano	12,78	14,28	223,48
I17-21299	Hojas arándano	20,98	50,45	2227,26
I18-22394	Hojas arándano	8,32	8,26	300,98
I18-22395	Hojas arándano	19,21	29,53	541,21
I18-22411	Hojas arándano	12,32	26,15	480,48
I17-21363	Hojas castaño	23,93	8,74	1240,47

ID Muestras	Descripción	FT (mgEAG/gps)	TC (mg EC/gps)	CA (μmol ET/gps)
I16-20490	Hojas castaño	19,95	19,95	55,41
I18-22391	Hojas castaño	26,25	5,55	266
I18-22392	Hojas castaño	28,81	6,04	276,96
I18-22393	Hojas castaño	29,91	7,16	327,09
I17-21365	Hojas roble	26,46	21,88	810,52
I16-20489	Hojas roble	27,09	21,29	326,38
I18-22388	Hojas roble	4,17	8,05	178,82
I16-20510	Hojas roble	43,87	33,45	237,57
I18-22389	Hojas roble	19,32	13,66	310,05
I18-22390	Hojas roble	10,67	11,03	168,97
I17-21285	Leguminosas	2,96	2,96	399,16
I16-20472	Leguminosas	3,91	3,35	360,96
I16-20465	Otras especies Bosque	1,31	3,98	75,08
I16-20468	Otras especies Bosque	6,24	4,84	283,28
I16-20484	Otras especies Bosque	5,95	8,17	160,01
I16-20486	Otras especies Bosque	1,06	3,24	119,84
I16-20503	Otras especies Bosque	10,72	22,5	113,83
I16-20504	Otras especies Bosque	11,97	35,6	1214,61
I16-20505	Otras especies Bosque	8,73	17,88	688,33
I17-21283	Otras especies Bosque	0,69	2,61	105,96
Tan/VegAp I17-21300	Otras especies Bosque	0,14	1,28	62,14
I17-21343	Otras especies Bosque	0,89	2,53	211,62
I17-21358	Otras especies Bosque	0,87	3,52	193,89
I18-22369	Otras especies Bosque	0,08	1,92	40,74
I18-22408	Otras especies Bosque	0,26	3,27	53,09
I18-22414	Otras especies Bosque	1,35	3,78	94,02
I17-21286	Otras especies Bosque (Compuestas)	7,43	5,16	294,7
I16-20467	Otras especies Bosque (Hypericum)	2,52	5,59	115,82

ID Muestras	Descripción	FT (mgEAG/gps)	TC (mg EC/gps)	CA (μmol ET/gps)
I16-20506	Otras especies Bosque (<i>Omphalodes nitida</i>)	0,42	2,3	94,37
I16-20470	Otras especies Prado	1,67	1,67	234,28
I16-20487	Otras especies Prado	0,9	2,71	114,76
I16-20488	Otras especies Prado	1,72	3,6	87,42
I17-21360	Otras especies Prado	1,68	2,63	254,94
I18-22372	Otras especies Prado	0,43	2,41	56,77
I18-22374	Otras especies Prado	0,67	2,46	36,51
I18-22381	Otras especies Prado	0,9	3,24	43,23