



## ***CAL02-018-C2-1. Nuevas tecnologías para la trazabilidad de ingredientes de origen animal y de piensos compuestos, para su incorporación en programas de calidad y seguridad alimentaria***

## ***AGL2002-03131. Detección y cuantificación de proteínas animales en piensos por micrografía y reflectancia en el infrarrojo cercano más inteligencia artificial. Diferenciación de especies por polimerasas***

### ***Responsable Proyectos***

Begoña de la Roza Delgado

### ***Organismo***

SERIDA

### ***Equipo Investigador***

Adela Martínez Fernández

SERIDA

Ana Soldado Cabezuelo

"

Fernando Vicente Mainar

"

Ana Garrido Varo

Univ. de Córdoba

Augusto Gómez Cabrera

"

Emiliano de Pedro Sanz

"

José Emilio Guerrero Ginel

"

M<sup>a</sup> Dolores Pérez Marín

"

### ***Equipo Técnico***

Sagrario Modroño Lozano

SERIDA

Ángeles Méndez García

"

Ovidio Fernández García

"

Alfonso Carballal Samalea

"

### ***Asesores***

Pablo Presa Martínez

Universidad de Vigo

Montserrat Pérez Rodríguez

"

Félix M<sup>a</sup> Goyache Goñi

SERIDA

## ***Objetivos***

- Establecer las bases metodológicas para la trazabilidad (cuantitativa y cualitativa) de diferentes ingredientes de origen animal mediante microscopía clásica.

- Definir las bases metodológicas para la trazabilidad (cuantitativa y cualitativa) de diferentes ingredientes de origen animal, mediante FT-NIR (Espectroscopia en el infrarrojo cercano por transformada de Fourier).

- Establecer las bases metodológicas para la trazabilidad (cuantitativa y cualitativa) de diferentes ingredientes de origen animal, mediante PCR (Reacción en cadena de la polimerasa).

## ***Resultados***

### ***Optimización de la identificación de ingredientes de origen animal por microscopía. Detección de factores que alteran la cuantificación de los mismos***

#### ***Preparación de la muestra***

La microscopía óptica, aunque adolece de limitaciones, sigue siendo la metodología oficial para el caso particular de la declaración de ingredientes en piensos. En el caso de aquéllos de origen animal permite, tras una separación por densidades de las distintas fracciones por una técnica de flotación diferencial, identificar



Cuadro 1.–Ventajas e inconvenientes de las diferentes formas de preparación de muestras

Mortero	1 mm	2 mm
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Según el tipo de ingrediente del pienso, pueden quedar partículas que dificultan la extracción en el embudo de decantación.</li> <li>• Las preparaciones quedan limpias y los sedimentos se recogen bien.</li> <li>• No se pierde material en la fracción &lt;0,125 mm.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Resulta muy costosa la extracción en el embudo de decantación.</li> <li>• Las preparaciones no quedan limpias y resulta difícil identificar los diferentes huesos.</li> <li>• El sedimento queda demasiado pulverulento y al tamizar se pierde la fracción &lt;0,125 mm.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Este tamaño de partícula permite realizar la extracción con comodidad.</li> <li>• Las preparaciones quedan limpias y los sedimentos se recogen bien y se pueden leer con facilidad.</li> <li>• El sedimento no queda pulverulento y no se pierde material en la fracción &lt;0,125 mm.</li> </ul>

la presencia de harinas de carne, harinas de pescado, sangre y/o huesos y otras proteínas elaboradas de origen animal. Por tanto, es vital utilizar una muestra representativa del material a utilizar, siendo determinante la fase de preparación en los resultados finales obtenidos.

Con el fin de optimizar el tratamiento previo de la muestra, se evaluaron tres formas de preparación de ésta: 1. utilizando un mortero, como recomienda la técnica oficial y 2. moliendo la muestra con dos pasos de luz diferente 1 y 2 mm.

El análisis estadístico mostró que en la detección de harinas de carne no existen diferencias significativas según el modo de preparación de muestras ( $P < 0,05$ ). Para las harinas de pescado, no existen diferencias entre 2 mm y mortero, pero sí se detectaron con 1 mm.

Las ventajas e inconvenientes de las diferentes formas de preparación de muestras se enumeran en el cuadro 1.

### **Muestras experimentales de referencia y Banco de muestras**

Se recogieron 358 muestras (harinas cárnicas y producto terminado) de referencia en las

diferentes empresas y entidades colaboradoras. En las harinas cárnicas se dispuso de información de las plantas de procesado en lo referente a los porcentajes de presencia de cada especie (bovino, ovino, ave, cerdo.....) y, en los productos terminados, se manejaron los datos de % de contaminación. Estas muestras, entraron a formar parte del banco de muestras y del banco de datos del SERIDA.

Además, se construyó una población de muestras experimentales a partir de piensos comerciales de vacuno en producción y cebo, que fueron contaminados con diferentes porcentajes de harinas de carne, sangre y pescado, de acuerdo con el esquema que se muestra en la tabla 1.

### **Establecimiento de una base de imágenes micrográficas de ingredientes de origen animal**

Se está generando una base de imágenes micrográficas, que se captan de forma simultánea al análisis de cuantificación de ingredientes por microscopía de las muestras.

Actualmente, la colección contiene 200 imágenes clasificadas como: producto entero





**Tabla 1.–Muestras de piensos compuestos experimentales con diferentes niveles de contaminación en proteínas animales elaboradas**

PIENSO	% de contaminación	CONTAMINANTE					
		HC	HS	HP <sub>1</sub>	HP <sub>2</sub>	HP <sub>3</sub>	HP <sub>4</sub>
PIENSO VACAS	0						
	0,100						
	0,125						
	0,200	12 muestras negativas					
	0,500	14 muestras contaminadas con harina de carne					
	1,000	14 muestras contaminadas con harina de sangre					
	1,500	56 muestras contaminadas con harina de pescado					
	3,000						
PIENSO CEBO	0						
	0,100	Total= 96 muestras experimentales					
	0,125						
	0,200						
	0,500						
	1,000						
	1,500						
	3,000						

HC: Harina de carne; HS: Harina de sangre; HP<sub>i</sub>: Diferentes harinas de pescado

(piensos y mezclas), ingredientes de origen vegetal (maíz, cebada, semilla de algodón, pulpa de remolacha,...) e ingredientes de origen animal. Estos últimos, a su vez, se clasificaron como componentes aislados en las diferentes fracciones de extracción (pesada, media y ligera) y dentro de cada fracción, se agruparon en función de la estructura y tipo de constituyente:

sangre, sangre en spray, glóbulos rojos, huesos de pescado, espinas, escamas, huesos de mamíferos, huesos de ave, pelos, plumas, músculos, etc.

Esta colección se seguirá ampliando durante el desarrollo del proyecto, para finalmente quedar implantada en la web del SERIDA: [www.serida.org](http://www.serida.org) para consulta.



**Aplicación de la tecnología FT-NIR para el análisis de ingredientes de origen animal en piensos en su estado natural y sus materias primas. Desarrollo y evaluación de ecuaciones de calibración**

**Forma de interacción radiación-muestra**

Con el fin de optimizar la información espectral, se estudiaron diferentes formas de interacción de la radiación con la muestra: reflectancia vs. transmitancia; distintas resoluciones; diversos tipos de cápsula, etc. De acuerdo con el trabajo previo, los parámetros espectrales seleccionados fueron los siguientes:

Rango de trabajo: 1000-2500 nm (10000-4000  $\text{cm}^{-1}$ ).

Resolución: 4  $\text{cm}^{-1}$ .

Número de barridos espectrales promediados en cada espectro: 30

Modo: Reflectancia (las muestras son muy opacas como para permitir la transmisión de luz), e *Interleaved* (Medida de la Relación Señal/ Fondo continua).

**Análisis FT-NIR cuantitativo. Obtención de ecuaciones de calibración**

Se procedió a la toma de espectros de absorción en espectroscopía por transformada de Fourier (equipo FT-NIR, modo reflectancia), con las condiciones descritas en el subapartado anterior, realizando dos cargas por muestra (se almacena el espectro promedio de 30 lecturas por duplicado de cada carga), utilizando una cápsula grande (placa Petri de 11 cm de diámetro en esfera integradora módulo NIRA).

Fueron desarrollados algunos modelos preliminares para evaluar la posibilidad de cuantificación de ingredientes de origen animal en la población de muestras experimentales. Para ello, se empleó el software quimiométrico Quant + ver. 4.51.02.

Aunque los resultados obtenidos en esta disciplina son menos exactos y precisos que los ya conocidos por la tecnología NIRS tradicional, cabe esperar mejoras significativas una vez que se profundice en los pretratamientos espectrales y modelos de regresión. No obstante, puede observarse claramente que los estadísticos obtenidos para la cuantificación del % en harina de sangre, resultaron excelentes (Tabla 2).

Tabla 2.—Estadísticos de calibración obtenidos por FT-NIR sobre las muestras experimentales (n= 96) por regresión de componentes principales

CONTAMINANTE	R <sup>2</sup>	ETC	ETP	CP <sub>s</sub>
% Harina de carne	67,10	0,58	0,62	3
% Harina de pescado	72,75	0,52	0,53	6
% Harina de sangre	<b>97,69</b>	<b>0,17</b>	<b>0,21</b>	8

R<sup>2</sup>: Coeficiente de determinación para la calibración.

ETC y ETP: Errores estándar de calibración y predicción, respectivamente.

CPs: n° de componentes principales utilizadas en la regresión.



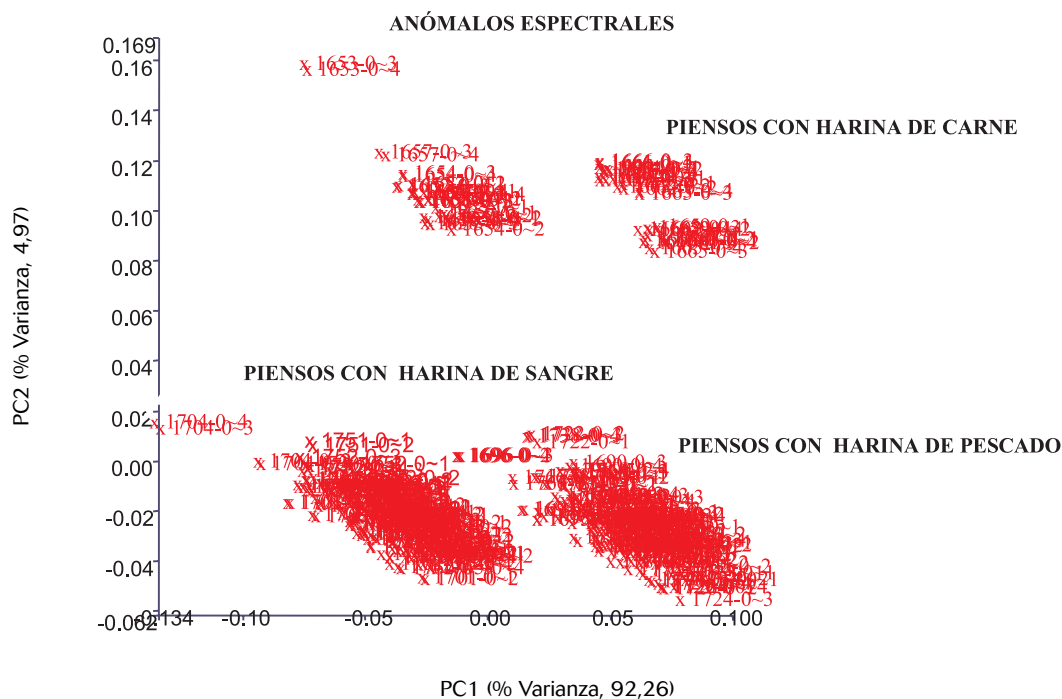


Figura 1.—Análisis de clasificación por componentes principales. PC1: primera componente principal; PC2: segunda componente principal

### **Análisis FT-NIR cualitativo: Obtención de modelos de clasificación y/o autenticación**

Se desarrollaron modelos quimiométricos para clasificar las muestras en función del tipo de ingredientes de origen animal. Para ello, se utilizó un modelo por componentes principales incluido en el software Quant + ver. 4.51.02.

En la figura 1 se puede apreciar, cómo el modelo desarrollado permite, mediante la distribución bidimensional en función de las dos primeras componentes principales elegidas (PC1 y PC2), las cuales explican el 97,23 % de la variabilidad poblacional, realizar una clasificación y diferenciación de las muestras de piensos contaminados con harinas animales en diferentes porcentajes (desde tres a 0,1 %). En general, las muestras contaminadas con harinas de carne se sitúan en la parte positiva del eje PC2, mientras que las que en su composi-

ción llevan harina de pescado o sangre quedan situadas en la parte negativa. A su vez, los piensos con harina de sangre están en la parte negativa de PC1 y con harina de pescado en la positiva.

### **Aplicación de la Microscopía FT-NIR (MNIR) a la trazabilidad de ingredientes de origen animal**

Esta tecnología consiste en el análisis NIR por transformada de Fourier de las partículas integrantes de un pienso compuesto; siendo ello posible por la conexión de un microscopio AutoIMAGE a un equipo FT-NIR, que permite la colección de espectros NIR de partículas (Figura 2) extremadamente pequeñas (< 5 micras). Las partículas pueden ser identificadas como proteínas de origen animal, harinas de carne, pescado y sangre, etc., una vez puesto a punto un sistema de reconocimiento por comparación con librerías espectrales. Posteriormente,



es posible, mediante la toma de espectros automática de una porción o área definida, cuantificar el porcentaje de los componentes a

través de la proporción del área de la imagen ocupada por las partículas del ingrediente o ingredientes considerados (Figura 3).

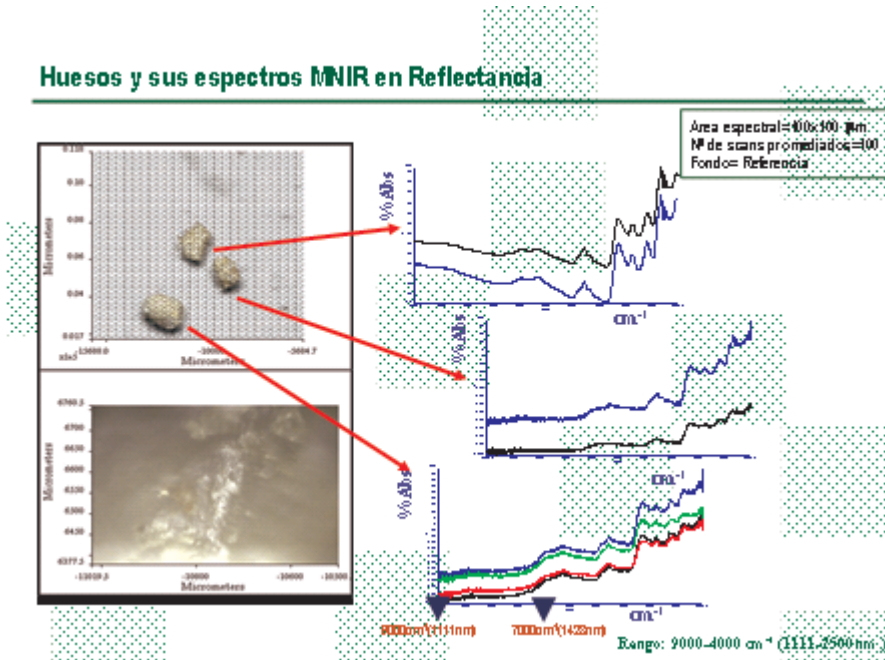


Figura 2.—Espectros MNIR de huesos procedentes de una contaminación con harina de carne de un pienso compuesto

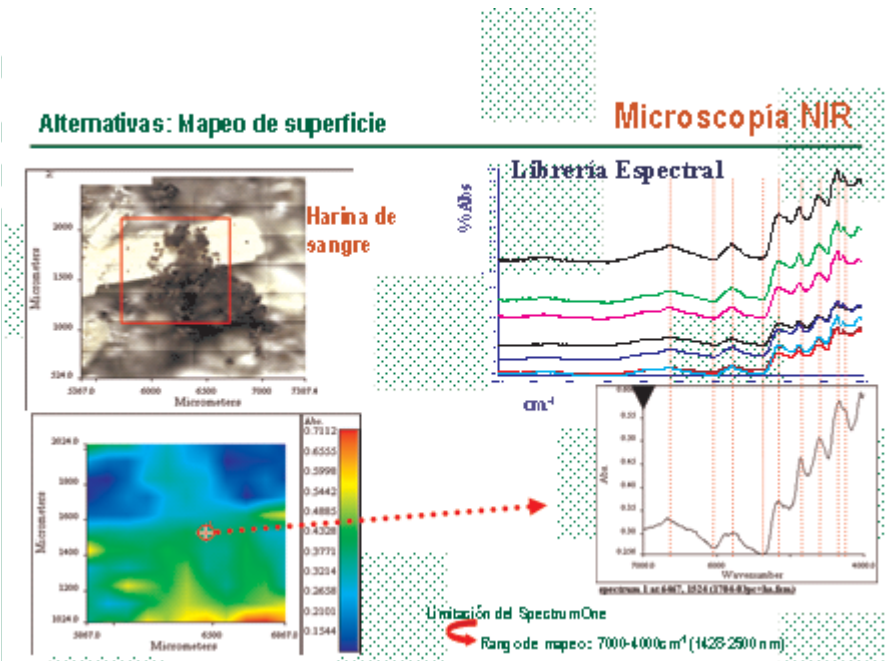


Figura 3.—Área delimitada para mapeo por superficie y posterior cuantificación de ingredientes





### **Optimización del análisis cualitativo y cuantitativo de ingredientes de origen animal en piensos compuestos y sus materias primas por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

Se realizó un rastreo genético en bases genómicas mediante una caracterización de los genes mitocondriales con los promotores FASTA y BLASTA y un diseño y ensayo de cebadores del gen citocromo b para la diagnosis de ingredientes de origen animal en piensos y sus

materias primas de acuerdo a las secuencias de bases por especie: rumiante (vacuno, ovino y caprino), no rumiante (aviar y porcino) y peces.

El logigrama establecido para el análisis cualitativo implica: 1- una primera PCR para confirmar si los constituyentes del pienso son 100 % de origen vegetal o contienen algún otro ingrediente orgánico. 2- segunda PCR que confirma si los restos anteriores no vegetales son de origen marino o terrestre. 3- tercera PCR que confirma si los restos terrestres pertenecen a una especie concreta de rumiante.

## **060000-2003-19. Trazabilidad de ingredientes y estrategias a seguir para incrementar la seguridad alimentaria en la producción animal**

### **Responsables Proyecto**

Rafael Peláez Valle  
Begoña de la Roza Delgado

### **Organismo**

CICA  
SERIDA

### **Resultados**

#### **Análisis de principios nutritivos**

Se obtuvieron los datos de referencia de los parámetros que se consideraron idóneos para establecer la trazabilidad y control de calidad en materias primas y productos finales, lo que permitió conocer la variabilidad intrínseca de estos alimentos en su composición nutritiva.

1. Materias primas: maíz (humedad, proteína, extracto etéreo, almidón y cenizas), cebada (humedad, proteína, fibra, almidón y cenizas), harina de soja (humedad, proteína, fibra y cenizas), pulpa de remolacha (humedad y cenizas), alfalfa deshidratada (humedad, proteína, fibra (fibra bruta –FB- fibra neutro detergente –FND- y fibra ácido detergente –FAD-), digestibilidad enzimática de la materia orgánica y cenizas) y heno de alfalfa (humedad, proteína, fibra (fibra bruta

### **Equipo Investigador**

Alejandro Argamentería Gutiérrez SERIDA  
Adela Martínez Fernández "  
Ana Belén Soldado Cabezuelo "

### **Equipo Técnico**

Ovidio Fernández García SERIDA  
M<sup>a</sup> Antonia Cueto Ardavín "

### **Objetivos**

- Determinar el contenido en principios nutritivos por métodos de referencia y toma de espectros NIRS.
- Desarrollar calibraciones NIRS para la predicción de la composición química.