



Universitat de Girona

ESTUDIO DE OTROS COMPUESTOS  
RELACIONADOS CON LA PRESENCIA DE OLOR  
SEXUAL NO ATRIBUIBLE AL ESCATOL Y A LA 5 $\alpha$ -  
ANDROST-16-EN-3-ONA EN GRASA DORSAL DE  
CERDO

**Ma. Àngels RIUS SOLÉ**

**ISBN: 84-688-8622-X**  
**Dipòsit legal: GI-1164-2004**



**ESTUDIO DE OTROS COMPUESTOS RELACIONADOS CON LA  
PRESENCIA DE OLOR SEXUAL NO ATRIBUIBLE AL ESCATOL Y A LA  
5a-ANDROST-16-EN-3-ONA EN GRASA DORSAL DE CERDO**

M.Angels Rius Solé



José Antonio García Regueiro, Profesor Asociado del Departament de Química de la Universitat de Girona y Jefe de la Unidad de Química Alimentaria del IRTA

CERTIFICA

Que los estudios recogidos en esta memoria bajo el título: **Estudio de otros compuestos relacionados con la presencia de olor sexual no atribuible al escatol y a la 5 $\alpha$ -Androst-16-en-3-ona en grasa dorsal de cerdo** han sido desarrollados bajo mi dirección por Maria Àngels Rius Solé, licenciada en Ciencias Biológicas y Bioquímica, y que constituye su Tesis para optar al grado de Doctor por la Universitat de Girona

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmo la presente certificación

Dr. J. A. García Regueiro

Girona, 21 de septiembre de 1999

## **AGRADECIMIENTOS**

Deseo expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas e Instituciones que han contribuido a la realización de este trabajo, de modo especial al Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA) y en particular al Director del Centre de Tecnologia de la Carn (CTC), Dr. Josep Maria Monfort Bolívar. Agradezco al Dr. José Antonio García-Regueiro la dirección y dedicación a este trabajo y al Dr. Alejandro Diestre Schilling por sus valiosas sugerencias.

A todos mis compañeros del CTC, en especial a la Dra. Isabel Díaz López, a la Dra. Maria Hortós Bahí y a la Sra. Glòria Casademont Perich por sus observaciones en los análisis químicos y por su apoyo y colaboración durante la elaboración de este trabajo. Al Sr. Luis Guerrero Asorey y al Dr. Pere Gou Botó por su inestimable ayuda en la evaluación estadística de los datos experimentales. A la Dra. Carmen Sárraga Escolano, al Sr. Angel Valero Pamplona, al Sr. Eugeni Anselmet Güell, al Sr. Narcís Sais Sabater, al Sr. José Luís Mauricio Foche y al Dr. Ciriaco Maraschiello De Zuani, por su cordial ayuda.

Al Centre de Referència en Tecnologia dels Aliments de la Generalitat de Catalunya (CeRTA) y a la CIRIT por la concesión de la beca predoctoral para la realización del presente trabajo.

A mi familia por su comprensión y apoyo durante la redacción de la presente memoria.

La realización del presente trabajo ha sido posible gracias a la financiación del proyecto europeo AIR 3-PL94-2482.

## ABREVIATURAS

### Compuestos

5 $\alpha$ -An,	5 $\alpha$ -androst-16-en-3-ona
5 $\alpha$ -An-3 $\alpha$ -ol,	5 $\alpha$ -androst-16-en-3 $\alpha$ -ol
5 $\alpha$ -An-3 $\beta$ -ol,	5 $\alpha$ -androst-16-en-3 $\beta$ -ol
2-ICA,	ácido 2-indolcarboxílico
DHA,	dehidroepiandrosterona
LH,	hormona luteneizante
MII,	6-sulfatohidroxiescatol
Pro-MII,	6-hidroxiescatol
MIII,	3-hidroxi-3-metiloxindol
MX,	3-[N-acetilcisteina-S-il]-metilindol
C10:0,	ácido decanoico (cáprico)
C12:0,	ácido dodecanoico (laúrico)
C14:0,	ácido tetradecanoico (mirístico)
C15:0,	ácido pentadecanoico
C16:0,	ácido hexadecanoico (palmítico)
C16:1(n-9),	ácido hexadecenoico
C16:1(n-7),	ácido 9-hexadecenoico (palmitoleico)
C17:0,	ácido heptadecanoico (margárico)
C17:1,	ácido heptadecenoico
C18:0,	ácido octadecanoico (esteárico)
C18:1(n-9),	ácido octadecenoico (oleico)
C18:1(n-7),	ácido octadecenoico (vacénico)
C18:2,	ácido octadecadienoico (linoleico)
C18:3 $\alpha$ ,	ácido 9,12, 15-octadecatrienoico ( $\alpha$ -linolenico)
C18:3 $\gamma$ ,	ácido 6, 9, 12-octadecatrienoico ( $\gamma$ -linolenico)
C20:0,	ácido eicosanoico (araquídico)
C20:1,	ácido eicosenoico (gadoleico)

C20:2,	ácido eicosadienoico
C20:3(n-6),	ácido 5,11,14-eicosatrienoico
C20:3(n-3),	ácido 7,11,14-eicosatrienoico
C20:4(n-6),	ácido 5,11,14,17-eicosatetranoico (araquidónico)
C22:6(n-3),	ácido docosahexenoico (DHA)
C24:0,	ácido tetracosanoico (linocérico)
ΣSAT,	suma total de los ácidos grasos saturados
ΣINSAT,	suma total de los ácidos grasos insaturados
ΣPOLISAT,	suma total de los ácidos grasos poliinsaturados
ΣPOLISAT/ΣSAT,	relación entre la suma de ácidos grasos poliinsaturados y saturados
ΣPOLISAT/ΣINSAT,	relación entre la suma de ácidos grasos poliinsaturados e insaturados
ΣSAT/ΣINSAT,	relación entre la suma de ácidos grasos saturados e insaturados

### **Metodologías analíticas**

GC,	cromatografía de gases
HPLC,	cromatografía líquida de alta resolución
HPLC-FN,	cromatografía líquida de alta resolución en fase normal
HPLC-FR,	cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa
TLC,	cromatografía en capa fina
SFE,	extracción de líquidos en el estado supercrítico
SFC-MS,	cromatografía en el estado supercrítico acoplada a la espectrometría de masas
Py-MS,	pirólisis acoplada a la espectrometría de masas
FID,	detector de ionización de llama
NPD,	detector de fósforo y nitrógeno
ECD,	detector de captura de electrones
UV,	detector ultravioleta
PTV,	inyector de temperatura programada
MS,	espectrometría de masas
SIM,	<i>selected ion monitoring</i>
TIC,	<i>total ion chromatogram</i>

ELISA,       enzimainmunoensayo

RIA,         radioinmunoensayo

## **Muestras**

BB, muestras de grasa con concentraciones bajas de escatol (<0,10 µg/g) y androstenona (<0,50 µg/g)

BA, muestras de grasa con concentraciones bajas de escatol (<0,10 µg/g) y altas de androstenona (>1,0 µg/g)

BM, muestras de grasa con concentraciones bajas de escatol (<0,10 µg/g) y medias de androstenona (0,50-1,0 µg/g)

MM, muestras de grasa con concentraciones medias de escatol (0,11-0,21 µg/g) y androstenona (0,50-1,0 µg/g)

MB, muestras de grasa con concentraciones medias de escatol (0,11-0,21 µg/g) y bajas de androstenona (<0,50 µg/g)

MA, muestras de grasa con concentraciones medias de escatol (0,11-0,21 µg/g) y altas de androstenona (>1,0 µg/g)

AB, muestras de grasa con concentraciones altas de escatol (>0,22 µg/g) y bajas de androstenona (<0,50 µg/g)

AM, muestras de grasa con concentraciones altas de escatol (>0,22 µg/g) y medias de androstenona (0,50-1,0 µg/g)

AA, muestras de grasa con concentraciones altas de escatol (>0,22 µg/g) y androstenona (>1,0 µg/g)

C,       muestras de grasa sin olor sexual

BT,     muestras de grasa con olor sexual

DK,     Dinamarca

ES,     España

FR,     Francia

NL,     Holanda

UK,     Reino Unido

SE,     Suecia

## Otros

$t_R$ ,	tiempo de retención
$R_s$ ,	resolución cromatográfica
$k$ ,	factor de capacidad
FSOT	columnas capilares de tubo hueco de sílice fundida
EV	electron-voltio
IS	patrón interno
$X$ ,	medias por mínimos cuadrados
CV,	coeficiente de variación
ET,	error típico
DE,	desviación estándar
PCA,	análisis de componentes principales
$C_{18}$	columnas octadecilsílica
UE	Unión Europea
MAPA	Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación
FAO	Organización de Agricultura y Alimentación



1. Introducción.....	1
1.1. Importancia económica de la producción y del consumo de carne .....	3
1.2. El concepto de calidad carne .....	13
1.2.1. Alteraciones del músculo <i>post-mortem</i> .....	13
1.2.2. Alteraciones de la calidad de la grasa .....	16
1.3. El olor sexual.....	17
1.3.1. Ventajas e inconvenientes de la producción de cerdos enteros. Situación actual en algunos países europeos.....	17
1.3.2. Compuestos responsables del olor sexual.....	21
1.3.2.1. El indol y escatol .....	21
1.3.2.1.1. Factores que determinan la producción de escatol .....	25
1.3.2.1.1.1. Influencia de la dieta.....	25
1.3.2.1.1.2. Influencia de los antibióticos .....	28
1.3.2.1.2. Absorción y metabolismo del escatol .....	28
1.3.2.1.3. Factores que determinan la acumulación de escatol e indol en el tejido adiposo.....	33
1.3.2.2. Los esteroides .....	36
1.3.2.2.1. Biosíntesis de la androstenona y otros esteroides .....	41
1.3.2.2.2. Metabolismo y eliminación de la androstenona.....	49
1.3.2.2.3. Factores que influyen en la concentración de androstenona en el tejido adiposo.....	51
1.3.2.2.3.1. Influencia del peso y de la edad de sacrificio.....	51
1.3.2.2.3.2. Influencia de los factores ambientales .....	53
1.3.2.2.3.3. Influencia de la alimentación.....	53
1.3.2.2.3.4. Influencia de las relaciones entre los miembros de un grupo.....	54
1.3.2.2.3.5. Influencia de los factores genéticos .....	54
1.3.2.3. Métodos analíticos .....	55
1.3.3.1. Métodos de análisis rápidos .....	56
1.3.3.1.1. Métodos colorimétricos .....	56
1.3.3.1.1.1. Indol y Escatol.....	56
1.3.3.1.1.2. Androstenona.....	57
1.3.3.1.2. Métodos inmunológicos: RIA y ELISA.....	58
1.3.3.1.3. Pirólisis .....	61
1.3.3.1.4. Extracción de líquidos en el estado supercrítico acoplada a la espectrometría de masas (SFE/GC-MS).....	62
1.3.3.1.5. Cromatografía en el estado supercrítico acoplada a la espectrometría de masas (SFC-MS) .....	63
1.3.3.1.6. La nariz electrónica con red neuronal .....	63
1.3.3.2. Métodos cromatográficos .....	66

1.3.3.2.1. Cromatografía de gases .....	67
1.3.3.2.1.1. Análisis de indol y escatol.....	67
1.3.3.2.1.2. Determinación de androstenona y androstenoles .....	71
1.3.3.2.2. Cromatografía líquida de alta resolución.....	76
1.3.3.2.2.1. Determinación de escatol e indol.....	76
1.3.3.2.2.2. Determinación de la androstenona.....	79
1.3.3.2.2.3. Determinación de la androstenona y del escatol.....	82
1.3.3.3. Metodologías indirectas .....	82
1.3.4. Porcentajes de distribución de la concentración de escatol y androstenona en las canales de cerdos enteros .....	83
1.3.5. Límites de detección de los compuestos relacionados con el olor sexual. Comparación entre métodos químicos y sensoriales .....	85
1.3.6. Consideraciones generales de los estudios de los panel-test y test de consumidores.....	89
1.3.7. Contribución del escatol y de la androstenona al olor sexual.....	90
1.3.8. Prevención.....	96
1.3.8.1. Reducción del escatol.....	96
1.3.8.2. Reducción de la concentración de androstenona en el tejido adiposo.....	96
1.3.8.3. Reducción de la concentración de androstenona y escatol en grasa.....	98
1.3.9. El olor sexual en los productos derivados .....	101
1.4. Objetivos .....	105
2. MATERIAL Y METODOS .....	107
2.1. Aparatos y Reactivos .....	109
2.2. Selección de las muestras .....	110
2.2.1. Toma de muestras .....	110
2.2.2. Recogida de muestras .....	110
2.2.3. Análisis de los compuestos responsables del olor sexual. Selección de las muestras de grasa para el estudio de otros compuestos que puedan contribuir al olor sexual.....	112
2.3. Métodos analíticos.....	114
2.3.1. Determinación de indol y escatol mediante HPLC-FN.....	114
2.3.1.1. Extracción de indol y escatol de muestras de grasa.....	114
2.3.1.2. Extracción de indol y escatol de muestras de músculo <i>longissimus dorsi</i> .....	114
2.3.1.3. Condiciones cromatográficas.....	115
2.3.2. Determinación de la androstenona y de los androstenoles en muestras de grasa dorsal de cerdo mediante GC-MS.....	115
2.3.2.1. Extracción de los compuestos de muestras de grasa dorsal .....	115
2.3.2.2. Purificación de los extractos grasos .....	117
2.3.2.3. Condiciones cromatográficas.....	117

2.3.3. Determinación conjunta de los compuestos relacionados con el olor sexual en grasa dorsal de cerdo entero.....	118
2.3.3.1. Preparación de las muestras .....	118
2.3.3.2. Purificación de los extractos grasos con columnas de sílica.....	120
2.3.3.2.1. Derivatización de los androstenoles .....	121
2.3.3.2.2. Condiciones cromatográficas .....	121
2.3.3.2.2.1. Análisis de indol y escatol mediante HPLC-FN.....	121
2.3.3.2.2.2. Análisis de androstenona y androstenoles mediante GC-MS .....	122
2.3.3.3. Purificación de los extractos grasos mediante cromatografía de filtración de gel.....	122
2.3.3.3.1. Condiciones cromatográficas .....	123
2.3.4. Determinación de la 4-fenil-3-buten-2-ona en muestras de grasa dorsal de cerdo entero.....	123
2.3.5. Determinación del porcentaje total de ácidos grasos en grasa dorsal de cerdo.....	124
2.3.5.1. Extracción de los compuestos .....	124
2.3.5.2. Condiciones cromatográficas.....	124
2.3.6. Análisis de volátiles .....	125
2.3.6.1. <i>Head Space</i> estático .....	125
2.3.6.1.1. Preparación de las muestras .....	125
2.3.6.1.2. Condiciones cromatográficas .....	125
2.3.6.2. <i>Head Space</i> dinámico.....	126
2.3.6.2.1. Preparación de las muestras .....	126
2.3.6.2.2. Condiciones cromatográficas .....	126
2.3.7. Evaluación sensorial .....	127
2.3.8. Modelo estadístico.....	127
2.3.8.1. Análisis de la varianza .....	127
2.3.8.2. Análisis de correlación.....	128
2.3.8.3. Análisis de componentes principales .....	128
3. RESULTADOS .....	129
3.1. Metodologías analíticas .....	131
3.1.1. Determinación de indol y escatol en muestras de grasa dorsal de cerdo entero mediante cromatografía líquida en fase normal (Rius, 1997, García-Regueiro y Rius, 1998).....	132
3.1.2. Determinación de androstenona y androstenoles en grasa dorsal de cerdo mediante cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas (Rius y García-Regueiro, 1998; Rius y col., submitted).....	142
3.1.3. Determinación de indol y escatol en muestras de músculo <i>longissimus dorsi</i> de cerdo mediante cromatografía líquida en fase normal y detección por fluorescencia (Rius y García-Regueiro, 1999 Submitted).....	155
3.1.3.1. Análisis de escatol e indol en muestras de músculo ( <i>longissimus dorsi</i> ), grasa de recubrimiento y grasa dorsal mediante HPLC-FN .....	157

3.1.4. Desarrollo de metodologías de purificación. Fraccionamiento de los extractos grasos mediante columnas de extracción de sílica .....	165
3.1.4.1. Tratamiento de las muestras .....	165
3.1.4.2. Purificación de los extractos de grasa mediante extracción en fase sólida con columnas de sílica.....	166
3.1.4.3. Análisis cromatográfico.....	168
3.2. Aplicación de las metodologías desarrolladas en el análisis de muestras de grasa dorsal de cerdo entero y hembras previamente clasificadas según los resultados de métodos no específicos .....	179
3.2.1. Determinación de indol y escatol en muestras de grasa dorsal procedente de cerdos enteros y hembras mediante HPLC-FN y detección por fluorescencia.....	179
3.2.2. Determinación de androstenona y androstenoles en muestras de grasa dorsal procedentes de cerdos enteros y hembras mediante GC-MS.....	199
3.3. Determinación del porcentaje de ácidos grasos totales en grasa dorsal de cerdos enteros y hembras mediante GC-FID .....	227
3.4. Análisis del perfil de volátiles en muestras de grasa dorsal procedentes de canales de cerdos enteros y hembras. Técnicas de <i>Head Space</i> .....	243
3.4.1. <i>Head Space</i> estático.....	243
3.4.2. <i>Head Space</i> dinámico.....	246
3.5. Aplicación de la metodología de extracción en fase sólida en las muestras de grasa dorsal de cerdo entero con concentraciones bajas de escatol y androstenona (grupo BB).....	293
3.6. Aplicación de la metodología de filtración de gel en muestras de grasa dorsal de cerdo entero con concentraciones bajas de escatol y androstenona (grupo BB).....	297
4. DISCUSIÓN .....	319
4.1. Metodologías analíticas desarrolladas en este estudio para la determinación de los compuestos relacionados con el olor sexual en muestras de grasa dorsal de cerdo.....	323
4.1.1. Determinación de indol y escatol en muestras de grasa dorsal de cerdo mediante HPLC-FN y detección por fluorescencia.....	323
4.1.2. Determinación de la androstenona y de los androstenoles en muestras de grasa dorsal de cerdo mediante GC-MS.....	326
4.2. Discrepancia entre la clasificación de las muestras de grasa dorsal de cerdo mediante métodos rápidos inespecíficos y métodos cromatográficos desarrollados en el presente estudio.....	330
4.3. Análisis de indol y escatol en muestras de músculo longissimus dorsi. Implicaciones en la correcta clasificación de las canales de cerdos enteros.....	345
4.4. Análisis de los porcentajes de ácidos grasos totales en muestras de grasa dorsal porcina.....	347
4.5. Análisis de los compuestos volátiles en muestras de grasa dorsal porcina mediante técnicas de <i>Head Space</i> .....	349
4.6. Algunas consideraciones sobre los compuestos identificados en muestras de grasa dorsal de cerdo con concentraciones bajas de escatol y androstenona (BB) mediante metodologías de purificación desarrolladas .....	359
5. CONCLUSIONES .....	371
6. BIBLIOGRAFÍA .....	377

Tabla 1.1. Composición en ácidos grasos de la grasa dorsal de cerdo según el sexo y la castración.....	20
Tabla 1.2. Métodos cromatográficos para la determinación de indol y escatol citados en la bibliografía.....	68
Tabla 1.3. Métodos analíticos para la determinación de androstenona citados en la bibliografía .....	69
Tabla 1.4. Separación por cromatografía de gases y sistemas de detección utilizados en los métodos citados en la bibliografía para la determinación de indol y escatol .....	72
Tabla 1.5. Separación por cromatografía de gases y sistemas de detección utilizados en los métodos citados en la bibliografía para la determinación de androstenona.....	77
Tabla 1.6. Separación por cromatografía líquida y sistemas de detección utilizados en los métodos citados en la bibliografía para la determinación de indol y escatol .....	80
Tabla 1.7. Separación por cromatografía líquida y sistemas de detección utilizados en los métodos citados en la bibliografía para la determinación de androstenona.....	81
Tabla 2.1. Distribución de las muestras de grasa seleccionadas según la concentración de escatol y androstenona determinada mediante métodos rápidos (Claus y col., 1997a; Hansen-Møller y Andersen, 1994).....	113
Tabla 2.2. Concentraciones en µg/g de indol, escatol y 7-etilindol (IS) adicionadas en las muestras de grasa dorsal y ng inyectados. Análisis mediante HPLC-FN.....	116
Tabla 2.3. Concentraciones en µg/g de indol, escatol y 7-etilindol (IS) adicionadas en las muestras de músculo longissimus dorsi y ng inyectados. Análisis mediante HPLC-FN.....	116
Tabla 2.4. Concentraciones en µg/g de androstenona, androstenoles y patrones internos adicionados en muestras de grasa dorsal de cerdo y ng inyectados. Análisis mediante GC-MS.....	119
Tabla 3.1. Repetibilidad del método analítico desarrollado en 7 muestras de grasa dorsal de cerdo fortificadas con 0,10 µg/g de indol, escatol y 7-etilindol. Análisis mediante HPLC-FN.....	140
Tabla 3.2. Rendimiento de extracción (%) obtenido para el escatol e indol mediante el método desarrollado en un total de 10 muestras de grasa. Análisis por HPLC-FN.....	140
Tabla 3.3. Concentraciones de indol y escatol (µg/g) determinadas en muestras comerciales de grasa dorsal de cerdo. Análisis mediante HPLC-FN.....	141
Tabla 3.4. Variabilidad de los tiempos de retención y del área absoluta de la androstenona y de los androstenoles en muestras de grasa dorsal (n=5) a las que se adicionaron 0,25 µg/g y 2,0 µg/g de los compuestos estudiados. Análisis mediante GC-MS. ....	151
Tabla 3.5. Variabilidad de los tiempos de retención y del área de la 5 $\alpha$ -androstan-3-ona y del 5 $\alpha$ -androstan-3 $\alpha$ -ol en muestras de grasa dorsal (n=10) con una concentración de 2,0 µg/g. Análisis mediante GC-MS. ....	152
Tabla 3.6. Eficiencia de extracción de la androstenona y de los androstenoles en muestras de grasa dorsal de cerdo de distintas concentraciones. Análisis mediante GC-MS.....	153
Tabla 3.7. Repetibilidad del método analítico desarrollado en 5 muestras de músculo longissimus dorsi de cerdo fortificadas con diferentes concentraciones de indol y escatol. Análisis mediante HPLC-FN.....	158
Tabla 3.8. Rendimiento de extracción (%) del escatol e indol mediante el método desarrollado en un total de 10 muestras de músculo longissimus dorsi de cerdo. Análisis mediante HPLC-FN.....	159

Tabla 3.9. Media por mínimos cuadrados (X) y error típico (ET) de la concentración (ng/g de tejido) de indol y escatol en grasa dorsal, grasa de recubrimiento y músculo longissimus dorsi de cerdo entero. Análisis mediante HPLC-FN y detección por fluorescencia.....	160
Tabla 3.10. Coeficientes de correlación de Pearson entre las concentraciones de indol y escatol (ng/g) de muestras de grasa dorsal, grasa de recubrimiento y músculo longissimus dorsi. Análisis mediante HPLC-FN.....	164
Tabla 3.11. Elución de los compuestos relacionados con el olor sexual en la purificación con columnas de sílica.....	167
Tabla 3.12. Linealidad del indol, escatol, androstenona y androstenoles en muestras de grasa dorsal purificadas con columnas de 2 y 10 gramos de sílica. Análisis mediante HPLC-FN y GC-MS. ....	175
Tabla 3.13. Porcentajes de recuperación del indol, escatol, androstenona y androstenoles en muestras de grasa dorsal purificadas con columnas de 2 gramos de sílica. Repetibilidad de la cuantificación de los compuestos respecto a los patrones internos utilizados. Análisis mediante HPLC-FN y GC-MS. ....	176
Tabla 3.14. Porcentajes de recuperación del indol, escatol, androstenona y androstenoles en muestras de grasa dorsal purificadas con columnas de 10 gramos de sílica. Repetibilidad de la cuantificación de los compuestos respecto a los patrones internos utilizados. Análisis mediante HPLC-FN y GC-MS. ....	177
Tabla 3.15. Medias por mínimos cuadrados (X) y error típico (ET) de las concentraciones (µg/g de grasa dorsal) de indol, escatol y de la concentración suma de ambos compuestos (Indol+Escatol) en cerdos enteros y hembras según los grupos de concentración considerados. Análisis mediante HPLC-FN.....	180
Tabla 3.16. Medias por mínimos cuadrados (X) y error típico (ET) de las concentraciones (µg/g de grasa dorsal) de indol, escatol y de la concentración suma de ambos compuestos (Indol+Escatol) en muestras de cerdos enteros y hembras clasificadas según la presencia o no de olor sexual. Análisis mediante HPLC-FN.....	181
Tabla 3.17. Medias por mínimos cuadrados (X) y error típico (ET) de las concentraciones (µg/g de grasa dorsal) de indol, escatol y de la concentración suma de ambos compuestos (Indol+Escatol) en canales de cerdos enteros y hembras clasificadas según el país de procedencia. Análisis mediante HPLC-FN.....	183
Tabla 3.18. Interacción Grupo x Clase de las concentraciones (µg/g de grasa dorsal) de indol, escatol y de la concentración suma de ambos compuestos (Indol+Escatol) en cerdos enteros y hembras. Medias por mínimos cuadrados (X) y error típico (ET). Análisis mediante HPLC-FN.....	184
Tabla 3.19. Interacción País x Clase de las concentraciones (µg/g de grasa dorsal) de indol, escatol y de la concentración suma de ambos compuestos (Indol+Escatol) en cerdos enteros y hembras. Medias por mínimos cuadrados (X) y error típico (ET). Análisis mediante HPLC-FN.....	185
Tabla 3.20. Concentraciones medias, mínimas y máximas de escatol e indol en muestras de grasa dorsal de cerdo entero (µg/g). Análisis mediante HPLC-FN.....	186
Tabla 3.21. Frecuencia de la distribución (%) de las concentraciones de escatol e indol en muestras de grasa dorsal de cerdo (n=42). Análisis mediante HPLC-FN.....	186

Tabla 3.22. Coeficientes de correlación de Pearson entre las concentraciones de indol, escatol y la concentración suma de ambos compuestos (Indol+Escatol) en grasa dorsal de cerdos enteros y hembras determinadas mediante diferentes métodos analíticos. Intervalo de concentraciones para el escatol: 0,02-0,80 equivalentes de escatol.....	193
Tabla 3.23. Coeficientes de correlación de Pearson entre las concentraciones de indol, escatol y la concentración suma de ambos compuestos (Indol+Escatol) en grasa dorsal de cerdos enteros y hembras determinadas mediante diferentes métodos analíticos. Intervalo de concentraciones para el escatol: 0,02-0,12 equivalentes de escatol.....	194
Tabla 3.24. Medias por mínimos cuadrados (X) y error típico (ET) de las concentraciones ( $\mu\text{g/g}$ de grasa dorsal) de $5\alpha\text{-An}$ , $5\alpha\text{-An-}3\alpha\text{-ol}$ , $5\alpha\text{-An-}3\beta\text{-ol}$ y de la concentración suma de los androstenoles ( $3\alpha\text{-ol}+3\beta\text{-ol}$ ) en cerdos enteros y hembras según los grupos de concentraciones considerados. Análisis mediante GC-MS. ....	200
Tabla 3.25. Medias por mínimos cuadrados (X) y error típico (ET) de la concentración ( $\mu\text{g/g}$ de grasa dorsal) de $5\alpha\text{-An}$ , $5\alpha\text{-An-}3\alpha\text{-ol}$ , $5\alpha\text{-An-}3\beta\text{-ol}$ y de la concentración suma de los androstenoles ( $3\alpha\text{-ol}+3\beta\text{-ol}$ ) en canales de cerdos enteros y hembras clasificadas según la presencia o ausencia de olor sexual. Análisis mediante GC-MS.....	201
Tabla 3.26. Medias por mínimos cuadrados (X) y error típico de las concentraciones ( $\mu\text{g/g}$ de grasa dorsal) de $5\alpha\text{-An}$ , $5\alpha\text{-An-}3\alpha\text{-ol}$ , $5\alpha\text{-An-}3\beta\text{-ol}$ y de la concentración suma de los androstenoles ( $3\alpha\text{-ol}+3\beta\text{-ol}$ ) en canales de cerdos enteros y hembras clasificadas según el país de procedencia. Análisis mediante GC-MS. ....	202
Tabla 3.27. Interacción Grupo x Clase de las concentraciones ( $\mu\text{g/g}$ de grasa dorsal) de $5\alpha\text{-An}$ , $5\alpha\text{-An-}3\alpha\text{-ol}$ , $5\alpha\text{-An-}3\beta\text{-ol}$ y de la concentración suma de los androstenoles ( $3\alpha\text{-ol}+3\beta\text{-ol}$ ) en cerdos enteros y hembras. Medias por mínimos cuadrados (X) y error típico (ET). Análisis mediante GC-MS.....	204
Tabla 3.28. Interacción País x Clase de las concentraciones ( $\mu\text{g/g}$ de grasa dorsal) de $5\alpha\text{-androst-}16\text{-en-}3\text{-ona}$ , $5\alpha\text{-androst-}16\text{-en-}3\alpha\text{-ol}$ , $5\alpha\text{-androst-}16\text{-en-}3\beta\text{-ol}$ y de la concentración suma de los androstenoles ( $3\alpha\text{-ol}+3\beta\text{-ol}$ ) en cerdos enteros y hembras. Medias por mínimos cuadrados (X) y error típico (X). Análisis mediante GC-MS. ....	205
Tabla 3.29. Concentraciones medias, mínimas y máximas de androstenona y androstenoles en muestras de grasa dorsal de cerdo entero ( $\mu\text{g/g}$ ). Análisis mediante GC-MS.....	206
Tabla 3.30. Frecuencia de la distribución (%) de la concentración de androstenona ( $\mu\text{g/g}$ ) en muestras de grasa dorsal de cerdo entero. Análisis mediante GC-MS. (n=42 muestras).....	206
Tabla 3.31. Coeficientes de correlación de Pearson entre la concentración de androstenona ( $\mu\text{g/g}$ de grasa dorsal) determinada mediante la aplicación de diversos métodos de análisis. Intervalo de concentraciones para la androstenona: 0,01-3,50 $\mu\text{g/g}$ .....	210
Tabla 3.32. Coeficientes de correlación de Pearson entre la concentración de androstenona ( $\mu\text{g/g}$ de grasa dorsal) determinada mediante la aplicación de diversos métodos de análisis. Intervalo de concentraciones para la androstenona 0,01-0,62 $\mu\text{g/g}$ .....	210
Tabla 3.33. Coeficientes de correlación de Pearson entre la concentración de indol, escatol, androstenona, androstenoles y la concentración suma de los compuestos indólicos (Indol+Escatol) y de los androstenoles ( $3\alpha\text{-ol}+3\beta\text{-ol}$ ) en muestras de grasa dorsal de cerdo entero y hembras. Análisis mediante HPLC-FN y GC-MS.....	217

Tabla 3.34. Composición (%) en ácidos grasos totales de la grasa dorsal de cerdos y hembras. Análisis de la varianza. Significaciones. Análisis mediante GC-FID.....	232
Tabla 3.35. Composición en ácidos grasos totales (%) de la grasa dorsal de cerdos enteros y hembras según los grupos de concentración de escatol y androstenona considerados. Medias por mínimos cuadrados (X) y error típico (ET). Análisis mediante GC-FID.....	233
Tabla 3.36. Composición en ácidos grasos totales (%) de la grasa dorsal de cerdos enteros y hembras según los grupos de concentración de escatol y androstenona considerados. Medias por mínimos cuadrados (X) y error típico (ET). Análisis mediante GC-FID.....	234
Tabla 3.37. Composición en ácidos grasos totales (%) de la grasa dorsal de cerdos enteros y hembras según el país de procedencia de las canales. Medias por mínimos cuadrados y error típico (ET). Análisis mediante GC-FID.....	235
Tabla 3.38. Composición en ácidos grasos totales (%) de la grasa dorsal de cerdos enteros y hembras según el país de procedencia de las canales. Medias por mínimos cuadrados y error típico (ET). Análisis mediante GC-FID.....	236
Tabla 3.39. Composición en ácidos grasos totales (%) de la grasa dorsal de cerdos enteros y hembras según la valoración sensorial de los miembros de un panel test. Medias por mínimos cuadrados (X) y error típico (ET). Análisis mediante GC-FID.....	237
Tabla 3.40. Composición (%) C24:0 y C22:6 de muestras de grasa dorsal de cerdos enteros y hembras. Análisis de la varianza. Interacción Grupo x Clase. Medias por mínimos cuadrados (X) y error típico (ET). Análisis mediante GC-FID.....	238
Tabla 3.41. Coeficientes de correlación de Pearson entre los porcentajes de ácidos grasos totales determinados en grasa dorsal de cerdos enteros y hembras. Análisis mediante GC-FID.....	239
Tabla 3.42. Coeficientes de correlación de Pearson entre los porcentajes suma de los ácidos grasos insaturados, saturados y poliinsaturados y las concentraciones de indol, escatol, androstenona y androstenoles ( $\mu\text{g/g}$ ) en grasa dorsal de cerdos enteros y hembras. Análisis mediante GC-FID, HPLC-FN y GC-MS. ....	240
Tabla 3.43. Coeficientes de correlación de Pearson entre los porcentajes de ácidos grasos totales y las concentraciones ( $\mu\text{g/g}$ ) de escatol, indol, androstenona y androstenoles en grasa dorsal de cerdos enteros y hembras. Análisis mediante GC-FID, HPLC-FN y GC-MS. ....	241
Tabla 3.44. Compuestos volátiles identificados en muestras de grasa dorsal porcina mediante técnicas de Head Space dinámico.....	248
Tabla 3.45. Medias por mínimos cuadrados (X) y error típico (ET) de las concentraciones de 1,4-diclorobenceno y estireno ( $\text{ng/g}$ de grasa dorsal) en muestras de cerdos enteros con concentraciones bajas de escatol y androstenona (BB) y clasificadas según la valoración sensorial de los miembros del panel test. Análisis mediante Head space dinámico.....	254
Tabla 3.46. Medias por mínimos cuadrados (X) y error típico (ET) de las concentraciones de indol y escatol ( $\text{ng/g}$ de grasa dorsal) en muestras de cerdos enteros con concentraciones altas de escatol (AA y AB) y clasificadas según la valoración sensorial de los miembros del panel test. Análisis mediante Head space dinámico.....	254



Tabla 3.47. Niveles de significación de las concentraciones (ng/g de grasa dorsal) de los aldehidos, ácidos, alcoholes y cetonas identificados en cerdos enteros y hembras. Análisis mediante técnicas de Head Space dinámico.....	256
Tabla 3.48. Niveles de significación de las concentraciones (ng/g de grasa dorsal) de los hidrocarburos y compuestos derivados del benceno y del furano identificados en cerdos enteros y hembras. Análisis mediante técnicas de Head Space dinámico.....	257
Tabla 3.49. Influencia del peso (kg) y porcentaje de magro de las canales en las concentraciones de los compuestos volátiles identificados en grasa dorsal porcina. Análisis mediante técnicas de Head Space dinámico.....	258
Tabla 3.50. Medias por mínimos cuadrados (X) y error típico (ET) de las concentraciones de los aldehidos, ácidos, alcoholes y cetonas (ng/g de grasa dorsal) identificados en canales de cerdos enteros y hembras clasificadas según la valoración sensorial de los miembros del panel test. Análisis mediante técnicas de Head Space dinámico.....	259
Tabla 3.51. Medias por mínimos cuadrados (X) y error típico (ET) de las concentraciones (ng/g de grasa dorsal) de los hidrocarburos y de los compuestos derivados del benceno y del furano identificados en canales de cerdos enteros y hembras clasificadas según valoración sensorial de los miembros del panel test. Análisis mediante técnicas de Head Space dinámico. ....	261
Tabla 3.52. Medias por mínimos cuadrados (X) y error típico (ET) de las concentraciones (ng/g de grasa dorsal) de los aldehidos identificados en canales de cerdos enteros y hembras clasificadas según los intervalos de concentraciones de escatol y androstenona considerados. Análisis mediante técnicas de Head Space dinámico.....	262
Tabla 3.53. Medias por mínimos cuadrados (X) y error típico (ET) de las concentraciones totales (ng/g de grasa dorsal) de los aldehidos identificados en canales de cerdos enteros y hembras clasificadas según los intervalos de concentración de escatol y androstenona y según valoración sensorial de los miembros del panel test Análisis mediante técnicas de Head Space dinámico.....	263
Tabla 3.54. Medias por mínimos cuadrados (X) y error típico (ET) de las concentraciones (ng/g de grasa dorsal) de los ácidos, alcoholes y cetonas identificados en canales de cerdos enteros y hembras clasificadas según los intervalos de concentraciones de escatol y androstenona. Análisis mediante técnicas de Head Space dinámico.....	265
Tabla 3.55. Medias por mínimos cuadrados (X) y error típico (ET) de las concentraciones (ng/g de grasa dorsal) de los hidrocarburos identificados en canales de cerdos enteros y hembras clasificadas según los intervalos de concentraciones de escatol y androstenona. Análisis mediante técnicas de Head Space dinámico.....	267
Tabla 3.56. Medias por mínimos cuadrados (X) y error típico (ET) de las concentraciones (ng/g de grasa dorsal) de los compuestos derivados del benceno y del furano identificados en canales de cerdos enteros y hembras clasificadas según los intervalos de concentraciones de escatol y androstenona. Análisis mediante técnicas de Head Space dinámico.....	268
Tabla 3.57. Medias por mínimos cuadrados (X) y error típico (ET) de las concentraciones (ng/g de grasa dorsal) de los aldehidos identificados en canales de cerdos enteros y hembras clasificadas según los países de procedencia. Análisis mediante técnicas de Head Space dinámico.....	269

Tabla 3.58. Medias por mínimos cuadrados (X) y error típico (ET) de las concentraciones (ng/g de grasa dorsal) de los ácidos orgánicos, alcoholes y cetonas identificados en canales de cerdos enteros y hembras clasificadas según los países de procedencia. Análisis mediante técnicas de Head Space dinámico.....	270
Tabla 3.59. Medias por mínimos cuadrados (X) y error típico (ET) de las concentraciones (ng/g de grasa dorsal) de los compuestos derivados del benceno y del furano identificados en canales de cerdos enteros y hembras clasificadas según los países de procedencia. Análisis mediante técnicas de Head Space dinámico.....	271
Tabla 3.60. Medias por mínimos cuadrados (X) y error típico (ET) de las concentraciones (ng/g de grasa dorsal) de los hidrocarburos identificados en canales de cerdos enteros y hembras clasificadas según los países de procedencia. Análisis mediante técnicas de Head Space dinámico.....	272
Tabla 3.61. Interacción Grupo x Clase de las concentraciones (ng/g de grasa dorsal) de los aldehidos identificados en canales de cerdos enteros y hembras. Medias por mínimos cuadrados (X) y error típico (ET). Análisis mediante técnicas de Head Space dinámico.....	274
Tabla 3.62. Interacción Grupo x Clase de las concentraciones (ng/g de grasa dorsal) de los aldehidos identificados en canales de cerdos enteros y hembras. Medias por mínimos cuadrados (X) y error típico (ET). Análisis mediante técnicas de Head Space dinámico.....	275
Tabla 3.63 Interacción Grupo x Clase de las concentraciones (ng/g de grasa dorsal) de los ácidos, alcoholes y cetonas identificadas en canales de cerdos enteros y hembras. Medias por mínimos cuadrados (X) y error típico (ET). Análisis mediante técnicas de Head Space dinámico...	276
Tabla 3.64. Interacción Grupo x Clase de las concentraciones (ng/g de grasa dorsal) de los derivados del benceno y del furano identificados en canales de cerdos enteros y hembras. Medias por mínimos cuadrados (X) y error típico (ET). Análisis mediante técnicas de Head Space dinámico...	277
Tabla 3.65. Interacción Grupo x Clase de las concentraciones (ng/g de grasa dorsal) de los hidrocarburos identificados en canales de cerdos enteros y hembras. Medias por mínimos cuadrados (X) y error típico (ET). Análisis mediante técnicas de Head Space dinámico.....	278
Tabla 3.66. Interacción Grupo x Clase de las concentraciones (ng/g de grasa dorsal) de los hidrocarburos identificados en canales de cerdos enteros y hembras. Medias por mínimos cuadrados (X) y error típico (ET). Análisis mediante técnicas de Head Space dinámico.....	279
Tabla 3.67. Interacción País x Clase de las concentraciones (ng/g de grasa dorsal) de 1-octen-3-ol y 2-heptanona en canales de cerdos enteros y hembras. Medias por mínimos cuadrados (X) y error típico (ET). Análisis mediante técnicas de Head Space dinámico.....	280
Tabla 3.68. Interacción País x Clase de las concentraciones (ng/g de grasa dorsal) de los derivados del benceno y del furano identificados en canales de cerdos enteros y hembras. Medias por mínimos cuadrados (X) y error típico (ET). Análisis mediante técnicas de Head Space dinámico...	281
Tabla 3.69. Interacción País x Clase de las concentraciones (ng/g de grasa dorsal) de los hidrocarburos identificados en canales de cerdos enteros y hembras. Medias por mínimos cuadrados (X) y error típico (ET). Análisis mediante técnicas de Head Space dinámico.....	282
Tabla 3.70. Interacción País x Clase de las concentraciones (ng/g de grasa dorsal) de los hidrocarburos identificados en canales de cerdos enteros y hembras. Medias por mínimos cuadrados (X) y error típico (ET). Análisis mediante técnicas de Head Space dinámico.....	283

Tabla 3.71. Coeficientes de correlación de Pearson entre las concentraciones de los ácidos y aldehídos identificados en muestras de grasa dorsal de cerdos enteros y hembras. Análisis mediante técnicas de Head Space dinámico.....	287
Tabla 3.72. Coeficientes de correlación de Pearson entre las concentraciones de los hidrocarburos, alcoholes, cetonas, compuestos derivados del benceno y del furano identificados en muestras de grasa dorsal de cerdos enteros y hembras. Análisis mediante técnicas de Head Space dinámico.....	288
Tabla 3.73. Coeficientes de correlación de Pearson entre las concentraciones (ng/g de grasa dorsal) de los compuestos identificados en muestras de grasa dorsal de cerdos enteros y hembras. Análisis mediante técnicas de Head Space dinámico.....	289
Tabla 3.74. Media por mínimos cuadrados (X) y error típico (ET) de la concentración (ng/g) de androstenona en grasa dorsal de cerdos enteros con concentraciones bajas de escatol y androstenona. Extracción en fase sólida con columnas de sílica. Análisis mediante GC-MS. ....	295
Tabla 3.75. Media por mínimos cuadrados (X) y error típico (ET) de la concentración (ng/g) del ácido 2-indolcarboxílico (TMS) en grasa dorsal de cerdos enteros con concentraciones bajas de escatol y androstenona (BB). Extracción en fase sólida con columnas de sílica. Análisis mediante GC-MS.....	295
Tabla 3.76. Medias por mínimos cuadrados (X) y error típico (ET) de las concentraciones (ng/g de grasa dorsal) de los compuestos relacionados con el olor sexual en cerdos enteros clasificados con concentraciones bajas de escatol y androstenona (BB). Análisis mediante cromatografía de filtración de gel y GC-MS. ....	301
Tabla 3.77. Familias de compuestos identificados en grasa dorsal de cerdo entero con concentraciones bajas de escatol y androstenona (BB). Análisis mediante cromatografía de filtración de gel y GC-MS. ....	302
Tabla 3.78. Medias por mínimos cuadrados (X) y error típico (ET) de las concentraciones (ng/g) de los compuestos identificados en grasa dorsal de cerdo entero con concentraciones bajas de escatol y androstenona. Cuantificación relativa respecto al patrón interno de los compuestos indólicos (7-etilindol) y de la androstenona (5 $\alpha$ -androstan-3-ona). Análisis mediante filtración de gel y GC-MS. ....	304
Tabla 3.79. Coeficientes de correlación de Pearson entre las concentraciones (ng/g) de los compuestos identificados en grasa dorsal de cerdo entero clasificadas con olor sexual y concentraciones bajas de escatol y androstenona. Análisis mediante filtración de gel y GC-MS. Cuantificación relativa respecto la concentración y el área del patrón interno de la androstenona (5 $\alpha$ -androstan-3-ona).....	314
Tabla 3.80. Coeficientes de correlación de Pearson entre las concentraciones (ng/g) de los compuestos identificados en muestras de grasa dorsal de cerdo entero clasificadas con olor sexual y concentraciones bajas de escatol y androstenona. Análisis mediante filtración de gel y GC-MS. Cuantificación relativa respecto la concentración y el área del patrón interno del escatol (7-etilindol).....	315

Figura 1.1. Distribución de la producción de carne en España durante 1997. Fuente: MAPA.....	5
Figura 1.2. Distribución de la producción porcina y avícola en las distintas comunidades autónomas españolas durante 1997. Fuente: MAPA.....	9
Figura 1.3. Distribución de la producción de vacuno y ovino en las distintas comunidades autónomas españolas durante 1997. Fuente: MAPA.....	11
Figura 1.4. Aspectos que definen la calidad de carne .....	15
Figura 1.5. Estructuras moleculares del triptófano, indol y escatol.....	22
Figura 1.6. Biosíntesis del indol y del escatol a partir del aminoácido L-Triptófano .....	23
Figura 1.7. Compuestos indólicos evaluados in vitro por su capacidad de actuar de sustratos en la síntesis de escatol (Jensen y col., 1995a).....	26
Figura 1.8. Metabolismo hepático del escatol .....	31
Figura 1.9. Estructuras moleculares de (a) 3(N-acetilcisteina-S-il)-metilindol (MX); (b) 3-hidroxi-3-metiloxindol (MIII); (c) 6-sulfatohidroxiescatol (MII) (Bæk y col., 1997).....	32
Figura 1.10. Estructuras moleculares de la androstenona y de los androstenoles.....	39
Figura 1.11. Estructuras moleculares de diversos C19- $\Delta$ 16-esteroides relacionados con el metabolismo de la androstenona.....	40
Figura 1.12. Biosíntesis de la pregnenolona, precursor común de los esteroides, a partir de acetil-CoA.....	43
Figura 1.13. Rutas de biosíntesis de los glucocorticoides y mineralocorticoides.....	44
Figura 1.14. Rutas de biosíntesis de las hormonas sexuales en el cerdo adulto. (1) ruta $\Delta$ 4, (2) ruta $\Delta$ 5 .....	46
Figura 1.15. Ruta de biosíntesis de los C19- $\Delta$ 16-esteroides .....	48
Figura 3.1. Separación cromatográfica de una solución patrón de indol, escatol y 7-etilindol según la composición de la fase móvil utilizada. (A) Hexano:2-propanol (98:2); (B) Hexano:2-propanol (94:6); (C) Hexano:2-propanol (90:10). Identificación de los picos: (1) 7-etilindol; (2) escatol; (3) indol. Análisis por HPLC-FN y detección por fluorescencia ( $\lambda_{exc}$ =280 nm y $\lambda_{em}$ =360 nm).....	134
Figura 3.2. Cromatograma de HPLC-FN y detección por fluorescencia ( $\lambda_{exc}$ =280 nm y $\lambda_{em}$ =360 nm) de una solución patrón de: (1) 7-etilindol, (2) escatol, (3) indol. Columna: Hypersil APS-2 (250 x 4,6 mm, 5 $\mu$ m).....	135
Figura 3.3. Cromatograma de HPLC-FN y detección por fluorescencia ( $\lambda_{exc}$ =280 nm y $\lambda_{em}$ =360 nm) de un extracto de grasa dorsal de cerdo entero. Columna: Hypersil APS-2 (250 x 4,6 mm, 5 $\mu$ m). Identificación de los picos: (1) 7-etilindol, (2) escatol, (3) indol.....	135
Figura 3.4. Cromatograma de HPLC-FN y detección por fluorescencia ( $\lambda_{exc}$ =280 nm y $\lambda_{em}$ =360 nm) de una solución patrón de: (1) 7-etilindol, (2) escatol y (3) indol. Columna: Hypersil APS-2 (100 x 4,6 mm, 3 $\mu$ m).....	136
Figura 3.5. Cromatograma de HPLC-FN y detección por fluorescencia ( $\lambda_{exc}$ =280 nm y $\lambda_{em}$ =360 nm) de un extracto de grasa dorsal de cerdo entero. Columna: Hypersil APS-2 (100 x 4,6 mm, 3 $\mu$ m). Identificación de los picos: (1) 7-etilindol, (2) escatol y (3) indol.....	136
Figura 3.6. Espectro de absorción en el ultravioleta (240-330nm) del (a) indol, (b) escatol y (c) 7-etilindol en una solución de hexano:2-propanol (92:8).....	137

Figura 3.7. Espectros de masas de la 5 $\alpha$ -androst-16-en-3-ona (A) y de la 5 $\alpha$ -androstan-3-ona (B). Análisis mediante GC-MS .....	145
Figura 3.8. Espectros de masas del 5 $\alpha$ -androst-16-en-3 $\alpha$ -ol (A), 5 $\alpha$ -androst-16-en-3 $\beta$ -ol (B) y 5 $\alpha$ -androstan-3 $\alpha$ -ol (C). Análisis mediante GC-MS .....	146
Figura 3.9. Cromatograma cGC-MS TIC de una solución patrón de 10 ng/ $\mu$ l. Picos: (1) 5 $\alpha$ -An-3 $\alpha$ -ol; (2) 5 $\alpha$ -An-3 $\beta$ -ol; (3) 5 $\alpha$ -An; (4) 5 $\alpha$ -androstan-3 $\alpha$ -ol; (5) 5 $\alpha$ -androstan-3-ona .....	147
Figura 3.10. Cromatograma cGC-MS SIM de una solución patrón de 10 ng/ $\mu$ l. Fragmentos seleccionados m/z 274, m/z 272 y m/z 243. Identificación de los picos: (1) 5 $\alpha$ -An-3 $\alpha$ -ol; (2) 5 $\alpha$ -An-3 $\beta$ -ol; (3) 5 $\alpha$ -An; (4) 5 $\alpha$ -androstan-3 $\alpha$ -ol; (5) 5 $\alpha$ -androstan-3-ona .....	147
Figura 3.11. Cromatograma cGC-MS SIM de un extracto de grasa dorsal de cerdo fortificada con 1 $\mu$ g/g de: (1) 5 $\alpha$ -An-3 $\alpha$ -ol; (2) 5 $\alpha$ -An-3 $\beta$ -ol; (3) 5 $\alpha$ -An; (4) 5 $\alpha$ -androstan-3 $\alpha$ -ol; (5) 5 $\alpha$ -androstan-3-ona. Fragmentos seleccionados m/z 274, m/z 272 y m/z 243 .....	148
Figura 3.12. Cromatograma de HPLC-FN y detección por fluorescencia ( $\lambda_{exc}$ =280 nm y $\lambda_{em}$ =360 nm) de un extracto de músculo longissimus dorsi porcino. Identificación de los picos: (1) 7-etilindol; (2) escatol; (3) indol.....	156
Figura 3.13. Cromatogramas de HPLC-FN y detección por fluorescencia ( $\lambda_{exc}$ =280 nm y $\lambda_{em}$ =360 nm) de (A) muestra de grasa dorsal, (B) muestra de grasa de recubrimiento y (C) muestra de músculo longissimus dorsi. Identificación de los picos: (1) 7-etilindol; (2) escatol; (3) indol.....	162
Figura 3.14. Comparación entre la concentración de indol (A) y de escatol (B) en muestras de grasa dorsal y muestras de músculo longissimus dorsi. Análisis mediante HPLC-FN. Las rectas de regresión fueron: $y = 0,187x - 0,410$ (indol) y $y = 0,0646x + 6,743$ (escatol) .....	163
Figura 3.15. Cromatograma de HPLC-FN y detección por fluorescencia ( $\lambda_{exc}$ =280 nm y $\lambda_{em}$ =360 nm) de un extracto de grasa fortificado con 0,20 $\mu$ g/g de escatol e indol correspondiente a la primera fracción eluida en columnas de aminopropilsilica. Identificación de los picos: (1) 7-etilindol; (2) escatol; (3) indol.....	170
Figura 3.16. Cromatograma GC-MS en modo SCAN de un extracto de grasa fortificado con 1 $\mu$ g/g de androstenona y 5 $\alpha$ -androstan-3-ona correspondiente a la segunda fracción eluida en columnas de aminopropilsilica. (A) ion total y (B) seleccionando los fragmentos de m/z 272 y m/z 274. Identificación de los picos: (1) 5 $\alpha$ -androstan-3-ona; (2) 5 $\alpha$ -androst-16-en-3-ona.....	171
Figura 3.17. Cromatograma de GC-MS en modo SCAN de los derivados trimetilsilil de una solución patrón: (1) 5 $\alpha$ -androst-16-en-3 $\alpha$ -ol; (2) 5 $\alpha$ -androst-16-en-3 $\beta$ -ol; (3) 5 $\alpha$ -androstan-3 $\alpha$ -ol y sus respectivos espectros de masas .....	172
Figura 3.18. Cromatograma de ion total en modo SCAN de un extracto de grasa fortificado con 1 $\mu$ g/g de 5 $\alpha$ -androst-16-en-3 $\alpha$ -ol y 5 $\alpha$ -androstan-3 $\alpha$ -ol correspondiente a la cuarta fracción eluida de una columna de sílica.....	173
Figura 3.19. Cromatograma en modo SCAN de un extracto de grasa fortificado con 1 $\mu$ g/g de 5 $\alpha$ -androst-16-en-3 $\alpha$ -ol y 5 $\alpha$ -androstan-3 $\alpha$ -ol seleccionando los fragmentos de m/z 241 y m/z 258. Identificación de los picos: (1) 5 $\alpha$ -androst-16-en-3 $\alpha$ -ol; (2) 5 $\alpha$ -androstan-3 $\alpha$ -ol.....	173

Figura 3.20. Cromatogramas de HPLC-FN y detección por fluorescencia ( $\lambda_{exc}=280$  nm y  $\lambda_{em}=360$  nm) de un extracto de grasa de cerdo con concentraciones de escatol: (A) bajas, (B) medias y (C) altas. Identificación de los picos: (1) 7-etilindol, (2) escatol y (3) indol..... 188

Figura 3.21. Cromatograma de HPLC-FN y detección por fluorescencia ( $\lambda_{exc}=280$  nm y  $\lambda_{em}=360$  nm) de un extracto de grasa dorsal de hembra clasificada con defecto sensorial. Identificación de los picos: (1) 7-etilindol, (2) escatol y (3) indol ..... 189

Figura 3.22. Cromatograma de HPLC-FN y detección por fluorescencia ( $\lambda_{exc}=280$  nm y  $\lambda_{em}=360$  nm) de un extracto de grasa dorsal de hembra clasificada sin defecto sensorial. Identificación de los picos: (1) 7-etilindol, (2) escatol y (3) indol..... 189

Figura 3.23. Cromatograma de HPLC-FN y detección por fluorescencia ( $\lambda_{exc}= 280$  nm y  $\lambda_{em}= 360$  nm) de una muestra de grasa dorsal de cerdo con concentraciones bajas de escatol y olor sexual. Identificación de los picos: (1) 7-etilindol, (2) escatol, (3) indol y (\*) pico no identificado ..... 190

Figura 3.24. Cromatograma de HPLC-FN y detección por fluorescencia ( $\lambda_{exc}= 280$  nm y  $\lambda_{em}= 360$  nm) de una muestra de grasa dorsal de cerdo con concentraciones bajas de escatol y sin olor sexual. Identificación de los picos: (1) 7-etilindol, (2) escatol, (3) indol y (\*) pico no identificado ..... 190

Figura 3.25. Relación entre la concentración de escatol ( $\mu\text{g/g}$  de grasa dorsal) determinada mediante el método colorimétrico (Hansen-Møller y Andersen, 1994) y el método de HPLC-FN desarrollado en este estudio según el intervalo de concentraciones de escatol considerado (A) 0,02-0,80 equivalentes de escatol ( $y= 0,755 x - 0,021$ ,  $R^2= 0,899$ ) y (B) 0,02-0,12 equivalentes de escatol ( $y= 0,347 x + 0,014$ ,  $R^2=0,196$ )..... 195

Figura 3.26. Relación entre la concentración de escatol ( $\mu\text{g/g}$  de grasa dorsal) determinada mediante el método colorimétrico (Hansen-Møller y Andersen, 1994) y la concentración suma de indol y escatol determinada mediante HPLC-FN según el intervalo de concentraciones de escatol considerado (A) 0,02-0,80 equivalentes de escatol ( $y= 1,101 x - 0,004$ ,  $R^2= 0,893$ ) y (B) 0,02-0,12 equivalentes de escatol ( $y= 0,716 x + 0,029$ ,  $R^2=0,183$ )..... 196

Figura 3.27. Análisis de componentes principales de las concentraciones de escatol e indol en muestras de grasa dorsal según los resultados de diferentes métodos analíticos (colorimétrico, HPLC-FN y HPLC-FR). Los símbolos representados indican la clasificación de las muestras determinada por los resultados del método (A) colorimétrico, (B) HPLC-FN desarrollado en este estudio y (C) considerando la concentración suma de indol y escatol determinada mediante HPLC-FN según los umbrales de concentración de escatol previamente establecidos: Baja ( $\leq 0,10 \mu\text{g/g}$ ), Media (0,11-0,21  $\mu\text{g/g}$ ) y Alta ( $\geq 0,22 \mu\text{g/g}$ ) ..... 197

Figura 3.28. Cromatogramas de GC-MS en modo TIC de muestras de grasa dorsal de cerdos enteros con concentraciones de androstenona (A) bajas, (B) medias y (C) altas. Identificación de los picos: (1)  $5\alpha$ -androst-16-en-3-ona, (2)  $5\alpha$ -androst-16-en-3 $\alpha$ -ol, (3)  $5\alpha$ -androst-16-en-3 $\beta$ -ol y (4)  $5\alpha$ -androstan-3-ona (IS).....207

Figura 3.29. Relación entre la concentración de androstenona ( $\mu\text{g/g}$  de grasa dorsal) determinada mediante ELISA (Claus y col., 1997a) y GC-MS según el intervalo de concentraciones de androstenona considerado: (A) 0,01-3,50  $\mu\text{g/g}$  de androstenona ( $y= 0,603 x + 0,034$ ,  $R^2= 0,892$ ) y (B) 0,01-0,62  $\mu\text{g/g}$  de androstenona ( $y= 0,561 x + 0,008$ ,  $R^2=0,819$ ) .....211

Figura 3.30. Relación entre la concentración de androstenona ( $\mu\text{g/g}$  de grasa dorsal) determinada mediante ELISA (Claus y col., 1997a) y la concentración suma de androstenona y androstenoles determinada por GC-MS según el intervalo de concentraciones de androstenona considerado: (A) 0,01-3,50  $\mu\text{g/g}$  de androstenona ( $y = 0,662x + 0,055$ ,  $R^2 = 0,872$ ) y (B) 0,01-0,62  $\mu\text{g/g}$  de androstenona ( $y = 0,646x + 0,006$ ,  $R^2 = 0,496$ )..... 212

Figura 3.31. Análisis de componentes principales de la concentración de androstenona y androstenoles en muestras de grasa dorsal según los diferentes métodos analíticos (ELISA, colorimétrico, HPLC-FR y GC-MS). Los símbolos representados indican la clasificación de las muestras determinada por los resultados (A) del método ELISA, (B) del método de GC-MS desarrollado en este estudio y (C) considerando la concentración suma de androstenona y androstenoles determinada mediante GC-MS según los umbrales de concentración de androstenona previamente establecidos: Baja ( $\leq 0,50 \mu\text{g/g}$ ), Media (0,5-1,0  $\mu\text{g/g}$ ) y Alta ( $\geq 1,0 \mu\text{g/g}$ )..... 213

Figura 3.32. Análisis de componentes principales de la concentración de escatol, indol, androstenona y androstenoles en muestras de grasa dorsal según los resultados de diferentes métodos analíticos (colorimétricos, HPLC-FN, HPLC-FR, ELISA). Los símbolos representados indican la clasificación de las muestras, según los umbrales de concentración de escatol y androstenona previamente establecidos, determinada por los resultados de los (A) métodos rápidos, (B) métodos de HPLC-FN y GC-MS y (C) considerando la concentración suma de indol-escatol determinada por HPLC-FN y androstenona-androstenoles determinada por GC-MS..... 219

Figura 3.33. Análisis de componentes principales de la concentración de escatol, indol, androstenona y androstenoles en muestras de grasa dorsal de cerdos y hembras con concentraciones de escatol y androstenona inferiores a 0,15  $\mu\text{g/g}$  y 0,50  $\mu\text{g/g}$ . Los símbolos representados indican la clasificación de las muestras, según los umbrales de concentración de escatol y androstenona previamente establecidos, determinada por los resultados de los (A) métodos de rápidos, (B) métodos de HPLC-FN y GC-MS y (C) considerando la concentración suma de indol-escatol determinada por HPLC-FN y androstenona-androstenoles determinada por GC-MS ..... 221

Figura 3.34. Distribución según la concentración de escatol y androstenona de las muestras de grasa dorsal de cerdo entero y hembras analizadas. Los símbolos representados indican la clasificación de las muestras, según los umbrales de concentración de escatol y androstenona previamente establecidos, determinada por los resultados de (A) métodos de HPLC-FN y GC-MS y (B) método colorimétrico para el escatol (Hansen-Møller y Andersen, 1994) y ELISA para la androstenona (Claus y col., 1997a) ..... 223

Figura 3.35. Distribución según la concentración de escatol y androstenona de las muestras de grasa dorsal de cerdos enteros y hembras analizadas. Los símbolos representados indican la clasificación de las muestras, según los umbrales de concentración de escatol y androstenona previamente establecidos, determinada por los resultados del método de HPLC-FN y GC-MS, considerando la concentración suma de escatol-indol y androstenona-androstenoles..... 225

Figura 3.36. Cromatograma de ácidos grasos totales de grasa dorsal de cerdos enteros. Análisis mediante GC-FID. Identificación de los picos: 1, C10:0; 2, C12:0; 3, C14:0; 4, C15:0; 5, C16:0; 6, C16:1(n-11); 7, C16:1(n-9); 8, C17:0; 9, C17:1; 10, C18:0; 11, C18:1(n-9); 12, C18:1(n-7); 13, C18:2(n-6); 14, C18:3 $\alpha$ ; 15, C20:1; 16, C20:2; 17, C20:3 (n-6); 18, C20:4; 19, C20:3 (n-3); 20, C24:0; 21, C22:6(n-3) ..... 228

Figura 3.37. Cromatograma de GC-FID de una solución patrón de (1) indol, (2) escatol y (3) androstenona obtenido mediante técnicas de Head Space estático.....	244
Figura 3.38. Cromatograma de GC-FID de una muestra de grasa dorsal de cerdo a la que se adicionaron 20 µg/g de escatol, indol y androstenona obtenido mediante técnicas de Head Space estático. Identificación de los picos: (1) indol y (2) escatol. Con una flecha se señala la zona del tR de la androstenona .....	245
Figura 3.39. Cromatograma TIC de GC-MS del perfil de volátiles de una muestra de grasa dorsal porcina mediante Head Space dinámico. Identificación de los picos: (1) tetrametilbutano, (2) heptano, (3) IS (d8-tolueno), (4) hexanal, (5) 2-heptanona, (6) estireno, (7) heptanal, (8) ácido hexanoico, (9) 2heptenal, (10) benzaldehido, (11) pentametilheptano, (12) decano, (13) octanal, (14) 1,4-diclorobenceno, (15), ácido heptanoico, (16) nonanal, (17) ácido octanoico, (18) 2-decenal, (19) 2,4-decadienal y (20) ftalato .....	251
Figura 3.40. (1) Cromatogramas de GC-MS en modo SCAN del perfil de volátiles de una muestra de grasa dorsal de cerdo entero con concentraciones bajas de escatol y androstenona: Head Space dinámico. (A) selección del fragmento m/z 146 y (B) cromatograma de ion total. (2) (A) Comparación entre el espectro de masas del compuesto identificado como 1,4-diclorobenceno (C) en las muestras analizadas y el espectro de la librería espectral (B). Identificación de los picos: (1) 1,4-diclorobenceno .....	255
Figura 3.41. Comparación del perfil de volátiles obtenido mediante Head Space dinámico en muestras de grasa dorsal de cerdo entero con concentraciones bajas de escatol y androstenona y clasificadas según la valoración sensorial de los miembros del panel test. Identificación de los picos: (1) hexanal, (2) heptanal, (3) octanal, (4) nonanal, (5) 2-decenal y (6) 2,4-decadienal .....	264
Figura 3.42. Análisis de componentes principales de los compuestos volátiles identificados en muestras de grasa dorsal de cerdo entero con concentraciones (A) bajas y (B) altas de escatol y androstenona .....	291
Figura 3.43. (A) Espectro de masas del pico identificado en la purificación de muestras de grasa dorsal de cerdo entero con concentraciones bajas de escatol y androstenona (cuarta fracción eluida de una columna de sílica) como ácido 2indolcarboxílico. (B) Espectro de masas del ácido 2-indolcarboxílico obtenido en la librería espectral.....	296
Figura 3.44. Cromatograma de GC-MS de una solución patrón de indol, escatol, androstenona, androstenoles y sus respectivos patrones internos. Sistema de detección: (A) modo TIC, (B) selección de los fragmentos m/z 117, m/z 130, m/z 145 y (C) selección de los fragmentos m/z 272, m/z 274, m/z 258, m/z 241. Identificación de los picos: (1) indol, (2) escatol, (3) 7-etilindol, (4) 5 $\alpha$ -androst-16-en-3 $\alpha$ -ol, (5) 5 $\alpha$ -androst-16-en-3 $\beta$ -ol, (6) 5 $\alpha$ -androst-16-en-3-ona, (7) 5 $\alpha$ -androstan-3 $\alpha$ -ol y (8) 5 $\alpha$ -androstan-3-ona.....	299
Figura 3.45. Cromatograma de GC-MS de una muestra de grasa dorsal de cerdo entero a la que se adicionó 1µg/g de 5 $\alpha$ -androstan-3-ona como patrón interno y se purificó mediante filtración. Sistema de detección: (A) modo TIC, (B) selección de los fragmentos obtenidos por impacto electrónico m/z 117, m/z 130, m/z 145 y (C) selección de los fragmentos obtenidos por impacto electrónico m/z 272, m/z 274. Identificación de los picos: (1) indol, (2) escatol, (3) 7-etilindol, (4) 5 $\alpha$ -androst-16-en-3 $\alpha$ -ol, (5) 5 $\alpha$ -androst-16-en-3 $\beta$ -ol, (6) 5 $\alpha$ -androst-16-en-3-ona y (7) 5 $\alpha$ -androstan-3-ona.....	300



Figura 3.46. Estructuras moleculares de la 4-fenil-3-buten-2-ona y de la etanona 2-(2-metilpropoxi)-1,2-difenil, compuestos identificados mediante GC-MS en muestras de grasa dorsal de cerdo clasificadas con olor sexual por los miembros de un panel test y con concentraciones bajas de escatol y androstenona..... 306

Figura 3.47. (A) Cromatograma de GC-MS en modo TIC y espectro de masas del pico identificado como 4-fenil-3-buten-2-ona en las muestras de grasa dorsal de cerdo entero con concentraciones bajas de escatol y androstenona analizadas mediante filtración de gel. (B) Comparación entre el espectro de masas del patrón de 4-fenil-3-buten-2-ona y el espectro de masas obtenido en la librería de espectros. Identificación de los picos: (1), 4-fenil-3-buten-2-ona.. 307

Figura 3.48. Cromatograma de HPLC-FR y espectro de ultravioleta (240-340 nm) de una solución patrón de 4-fenil-3-buten-2-ona (1)..... 308

Figura 3.49. Cromatograma de HPLC-FR y espectro ultravioleta (240-340nm) de un extracto de grasa dorsal de cerdo entero con olor sexual y concentraciones bajas de escatol y androstenona purificado mediante filtración de gel. Identificación de los picos: (1) 4-fenil-3-buten-2-ona..... 309

Figura 3.50. (A) Cromatograma de GC-MS en modo TIC y espectro de masas del pico identificado de forma tentativa como etanona 2-(2-metilpropoxi)-1,2-difenil en las muestras de grasa dorsal de cerdo entero clasificadas con olor sexual y concentraciones bajas de escatol y androstenona. Análisis mediante filtración de gel y GC-MS. (B) Comparación entre los espectros de masas del patrón de la etanona 2-(2-metilpropoxi)-1,2-difenil y el obtenido en la librería de espectros. Identificación de los picos: (1) etanona 2-(2-metilpropoxi)-1,2-difenil..... 312

Figura 3.51. (A) Cromatograma de GC-MS en modo TIC y espectro de masas del pico identificado de forma tentativa como fenol 2,4-bis-(1,1-dimetiletil) en las muestras de grasa dorsal de cerdo entero clasificadas con olor sexual y concentraciones bajas de escatol y androstenona. Análisis mediante filtración de gel y GC-MS. (B) Comparación entre los espectros de masas del compuesto identificado como fenol 2,4-bis-(1,1-dimetiletil) y el obtenido en la librería de espectros. Identificación de los picos: (1) fenol 2,4-bis-(1,1-dimetiletil)..... 313

Figura 3.52. Análisis de componentes principales de los compuestos identificados en muestras de grasa dorsal de cerdo entero clasificadas con olor sexual y concentraciones bajas de escatol y androstenona. Análisis mediante filtración de gel y GC-MS. (A) cuantificación relativa al patrón interno de la androstenona y (B) cuantificación relativa al patrón interno del escatol..... 317

Figura 4.1. Estructura química tridimensional de la 5 $\alpha$ -androst-16-en-3-ona..... 363

Figura 4.2. Estructura química tridimensional de la 4-fenil-3-buten-2-ona..... 365

## **CAPITULO I**

### *Introducción*

La carne ha sido una pieza clave en la alimentación humana a lo largo de la historia y, aunque su consumo ha experimentado numerosas oscilaciones, es un alimento de elevado valor nutritivo por su contenido en proteínas, lípidos, vitaminas y sales minerales. Actualmente, es uno de los principales componentes de la dieta de los países desarrollados.

### 1.1. Importancia económica de la producción y del consumo de carne

Los sistemas de producción y comercialización de carne son de gran importancia en la base económica de un país, especialmente a raíz de las condiciones de mercado libre que se han establecido entre los países miembros de la Unión Europea (UE). La producción de carne en España ha experimentado un crecimiento continuo en los últimos años, situándose en 4,18 millones de toneladas en 1997 (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, MAPA). Las principales comunidades autónomas productoras de carne fueron Cataluña con una producción estimada de 1,39 millones de toneladas y una tercera parte de la producción española total, seguida de Castilla y León con 513.000 toneladas y Andalucía con 439.000 toneladas (Anónimo, 1998).

La participación de España representó un 1,9% de la producción mundial durante 1997. Su contribución en la UE fue más significativa y ocupó la tercera posición con un 11,6% de los 35,81 millones de toneladas producidas en la UE en 1997 (Organización de Agricultura y Alimentación, FAO). Los principales países productores de carne de la UE fueron Francia (17,6%) y Alemania (16,5%) (Anónimo, 1998).

El sector más productivo de nuestro país fue el porcino con un 56,1% de la global, seguido del avícola (21,3%), del vacuno (14,3%) y del ovino (5,4%) (Figura 1.1). La carne de porcino se produce en todas las comunidades autónomas, siendo en todas ellas la principal producción, a excepción de la comunidad autónoma de Madrid, País Vasco, Cantabria y Canarias. La primera comunidad en cuanto a su producción es Cataluña con 896.000 toneladas (38,2%), seguida de Castilla y León (12,7%) y de Andalucía (10,9%) (Figura 1.2).



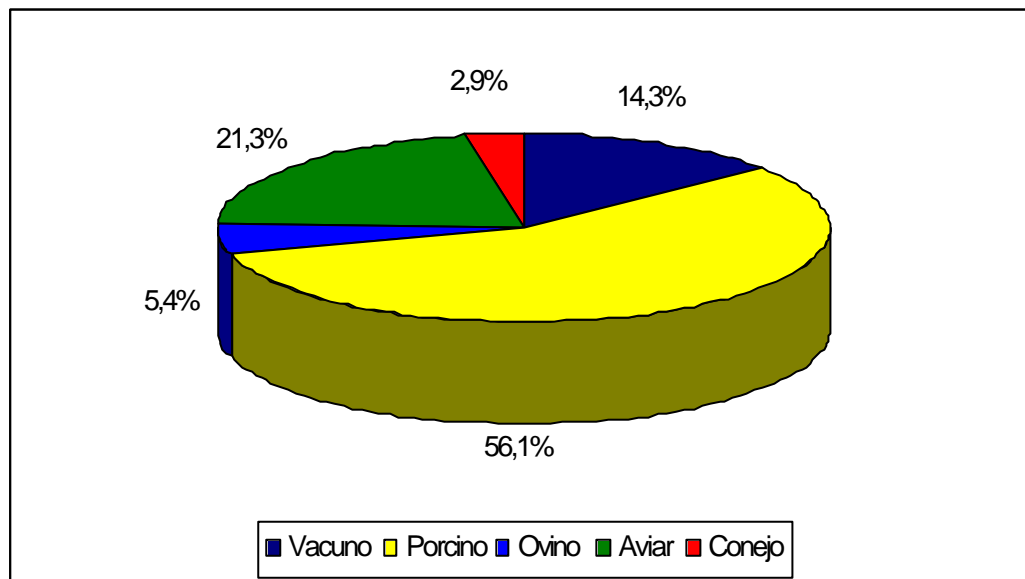


Figura 1.1. Distribución de la producción de carne en España durante 1997. Fuente: MAPA

España fue un país netamente exportador de carne porcina en 1997 y, a pesar de su elevado consumo interior, generó un importante excedente que se comercializó principalmente al resto de países de la UE y Rusia. En el ámbito de la UE, España es una potencia de primer orden, sólo superada por Alemania y con un nivel muy similar Francia. La producción española de carne porcina representó un 2,6% de la producción mundial (87,9 toneladas) y un 14,1% del total comunitario (16,5 millones de toneladas) (Anónimo, 1998). La producción de porcino en la UE ha crecido en los últimos años, hasta alcanzar valores de 16,3 millones de toneladas de carne y es, después de China, uno de los mayores productores mundiales de carne porcina (Anónimo, 1996).

El sector avícola es el sector de mayor producción después del porcino, alcanzando unos valores de 886.000 toneladas en 1997 (21,3% de la producción total). En el ámbito de la UE, Francia es el primer país productor y el Reino Unido el segundo, superando ambos el millón de toneladas. El porcentaje de carne de ave producida en España en 1997 representó un 1,4% a escala mundial y un 9,8% dentro de la UE (Anónimo, 1998). La producción avícola en las distintas comunidades autónomas españolas durante 1997 se presenta en la Figura 1.2.

La producción española de vacuno aumentó un 5% durante 1997, situándose en 593.381 toneladas (14,2% de la producción total). Las principales comunidades autónomas productoras de vacuno fueron Cataluña (126.000 toneladas) y Castilla y León (92.000 toneladas), aunque también fueron significativas la producción gallega (11,6%) y la producción de la Comunidad Autónoma de Madrid (8,5%). Los países del norte de Europa fueron los principales productores de la UE, mientras que España sólo representó un 6,5% de la producción europea (Anónimo, 1998).

La producción española de carne de ovino se encuentra repartida en todo el territorio nacional, siendo las comunidades con mayor nivel de producción: Cataluña (49.155 toneladas), Castilla y León (43.944 toneladas) y Aragón (37.602 toneladas). En estos últimos años, la producción española representó un 3,0% de la producción mundial y un 20,7% de la producción europea, únicamente superada por el Reino Unido (Anónimo, 1998).

La producción española de carne de vacuno y ovino en las distintas comunidades autónomas durante 1997 se presenta en la Figura 1.3.

La producción del sector cunícola ha experimentado un crecimiento notable durante los últimos doce años, incrementándose desde 77.000 toneladas en 1986 a 122.000 toneladas en 1997 (2,9% de la producción total española). En Europa, la producción de carne de conejo es típicamente mediterránea, siendo Italia, España y Francia los principales productores. La contribución española a la producción de carne de conejo representó un 12,4% y un 26,3% de la producción cunícola mundial y europea, respectivamente (Anónimo, 1998).

El consumo de carne y elaborados cárnicos en España supone una cuarta parte del gasto total en alimentación y bebidas. Según datos publicados por el MAPA, durante el año 1997 se consumieron aproximadamente 2,6 millones de toneladas de carne, que representaron un consumo de 65,5 quilos de carne y derivados cárnicos por persona y supuso un gasto superior a 1,8 billones de pesetas. Los productos cárnicos más consumidos fueron las carnes frescas, seguidas de los transformados, los despojos cárnicos y las carnes congeladas (Pozo, 1997; Anónimo, 1998).

Las carnes más consumidas en nuestro país fueron la carne de pollo, con algo más de 15 quilos por persona, seguida de la carne de vacuno con 8 quilos, la de porcino con 7 quilos y la de ovino, con aproximadamente 3 quilos. El consumo de derivados cárnicos, que se elaboran principalmente a partir de carne de porcino, se aproximó a 14 quilos por persona. Según los datos citados, las carnes más consumidas en nuestro país son la carne de cerdo, por su coste y sus múltiples aplicaciones en la elaboración de distintos productos cárnicos, seguida de la carne de ave y de vacuno (Anónimo, 1996).

En el ámbito de la UE, el consumo de carne porcina creció en 1996, situándose en 15,5 millones de toneladas y supuso un consumo per cápita de 41,7 quilos, cantidad considerablemente más elevada que los 31,6 quilos de 1973 (Pozo, 1997). El consumo de carne de vacuno ha experimentado diferentes oscilaciones en los últimos años a consecuencia de diferentes factores, como el clima de depresión económica, la competencia de carnes más baratas (cerdo y ave) y los problemas de imagen sanitaria originados a raíz de la aparición de las carnes BSE (Pozo, 1997).

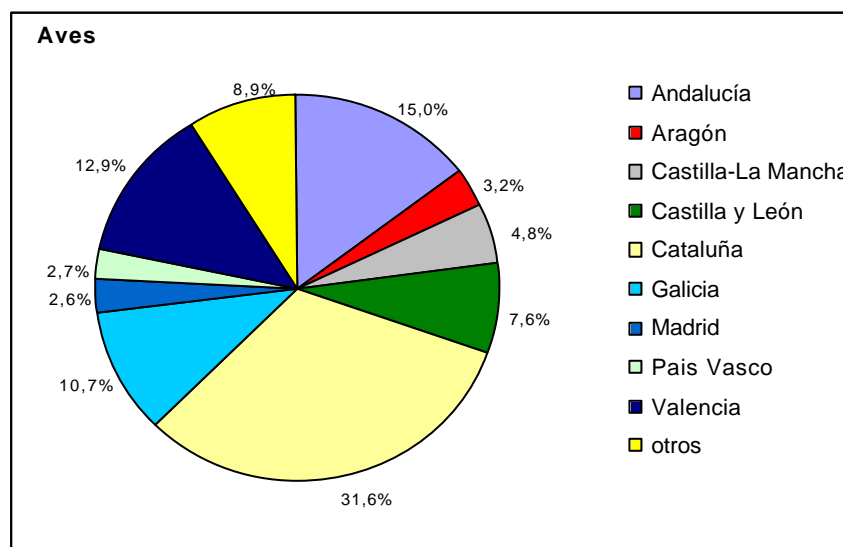
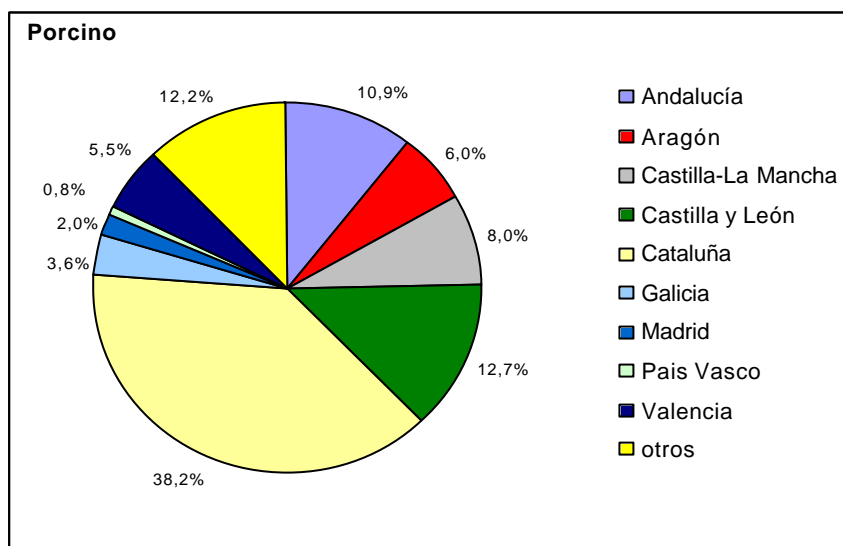


Figura 1.2. Distribución de la producción porcina y avícola en las distintas comunidades autónomas españolas durante 1997. Fuente: MAPA



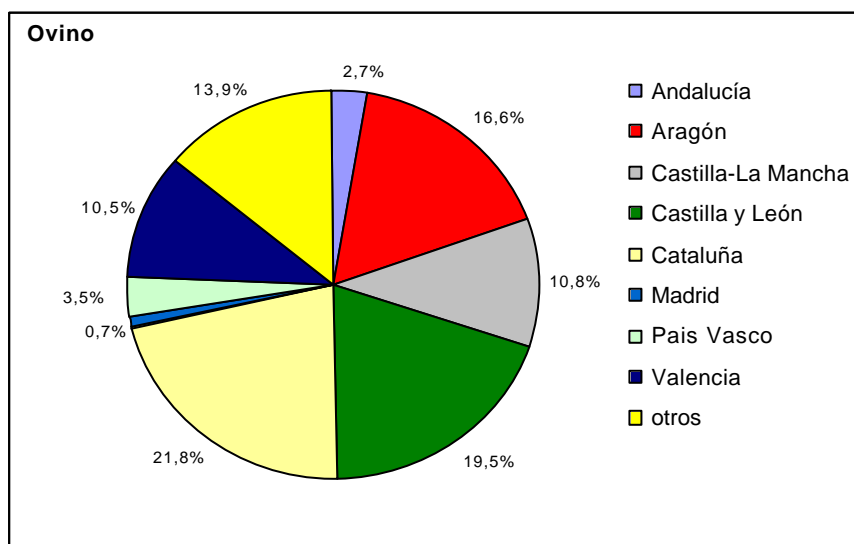
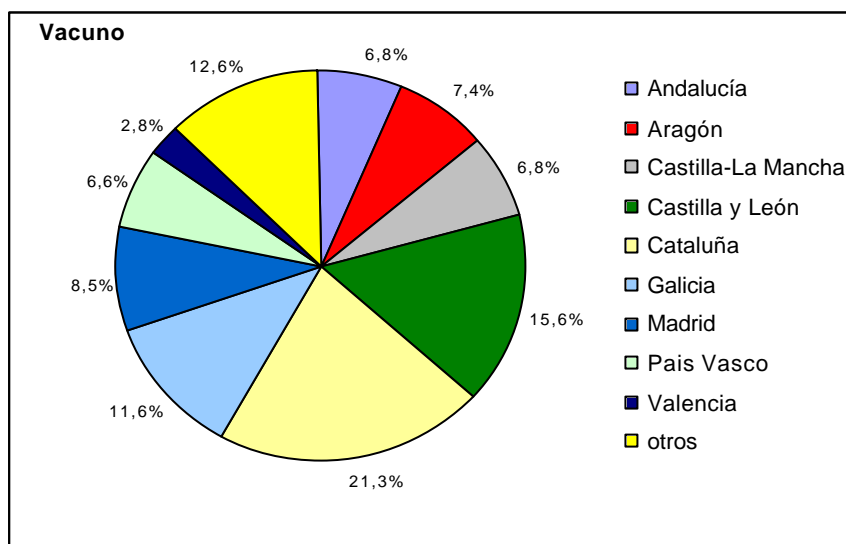


Figura 1.3. Distribución de la producción de vacuno y ovino en las distintas comunidades autónomas españolas durante 1997. Fuente: MAPA

## 1.2. El concepto de calidad de carne

La actitud de los consumidores respecto a la carne y a la totalidad de los productos cárnicos se ha modificado en los últimos años. La calidad, la influencia de la alimentación en la salud, las propiedades sensoriales y la imagen final de los productos alimentarios presentan una mayor valoración frente a los factores puramente económicos (Anónimo, 1996). La obtención de productos de calidad, que satisfagan las necesidades de los consumidores, requiere la utilización de materias primas de calidad, la aplicación de procesos tecnológicos óptimos y de métodos de envasado, transporte y venta que mantengan las características deseadas en el producto final.

El concepto de calidad de un producto cárnico no resulta fácil definir, pero pueden considerarse tres aspectos fundamentales: seguridad, nutrición y satisfacción. La seguridad está determinada por la ausencia de microorganismos patógenos, antibióticos, hormonas u otros compuestos químicos que pueden ser perjudiciales para la salud del consumidor. Los factores nutricionales se relacionan con la composición química de la carne o elaborado cárnico en aquellos constituyentes (proteínas, grasas, hidratos de carbono y micronutrientes) cuyo consumo se considera esencial para el buen desarrollo de nuestro metabolismo. Finalmente, la satisfacción, el placer de consumir, que está relacionada con las características sensoriales y físicas del producto (sabor, olor, color, dureza, textura).

### 1.2.1. Alteraciones del músculo post-mortem

La calidad de carne está determinada, básicamente, por la fisiología del músculo y de la grasa (Figura 1.4). Numerosos estudios han demostrado que los cambios bioquímicos del músculo post-mortem son responsables, en primera instancia, de la calidad tecnológica de la carne. Al extinguirse el oxígeno del músculo post-mortem, el metabolismo se transforma rápidamente en anaerobio y el glucógeno acumulado se metaboliza a ácido láctico. El incremento de la concentración de ácido láctico provoca una disminución del pH muscular desde 7,1-7,3 hasta valores próximos a 5,5 en un tiempo que está situado entre las cuatro y ocho horas post-mortem, estableciéndose el estado de rigor mortis (Bendall, 1973). No obstante, las canales que presentan un metabolismo glucolítico acelerado alcanzan valores bajos de pH a los 15 minutos post-mortem, cuando la temperatura es aún elevada. La combinación de pH bajos y temperaturas elevadas genera un descenso de la capacidad de

retención de agua del músculo, debido a la desnaturalización de las proteínas solubles y miofibrilares, un aumento del exudado muscular, de las pérdidas por goteo y un incremento de la evaporación de las canales y piezas (Greaser, 1986; Bendall y Swatland, 1988; Mikami y col., 1991). El resultado final de este proceso son carnes pálidas, blandas y exudativas que denominamos carnes PSE. El desarrollo de la condición PSE está relacionado con factores genéticos y ambientales y su incidencia en España es de un 30-35%, aproximadamente (Oliver y col., 1988).

La relación entre el síndrome del estrés porcino y la sensibilidad al test del halotano con la incidencia de carnes PSE en cerdos conformados se ha observado en diversos trabajos (Eikelenboom y Minkema, 1974; Webb y Simpson, 1986; Murray y col., 1989; Oliver y col., 1993). En general, las razas Landrace y Large White producen una mejor calidad tecnológica de carne, mientras que las razas con mayor desarrollo muscular (conformadas), como la Landrace Belga y la Pietrain, presentan una tendencia a producir carnes exudativas.

No se conoce un sistema efectivo para eliminar completamente los defectos de calidad de carne, aunque el tipo de alimentación, un periodo de ayuno antes del sacrificio, el manejo de los animales y los factores que producen estrés durante el transporte y sacrificio inciden notablemente sobre la calidad de carne (Smulders y col., 1983; Lambooy y col., 1985; Warris, 1987; Grandin, 1988; Tarrant, 1988).

En otras ocasiones, un periodo ante-mortem prolongado provoca un agotamiento de las reservas energéticas del músculo en el animal vivo, que contribuye al desarrollo de carnes de elevado pH ( $\text{pH} > 6$ ), color oscuro y aspecto seco, denominadas carnes DFD. La carne DFD es más susceptible al deterioro por la mayor facilidad de crecimiento de los microorganismos a pH elevado y por su menor contenido en glucógeno, que facilita la degradación microbiana de los aminoácidos y la aparición de olores pútridos (Newton y Gill, 1981).

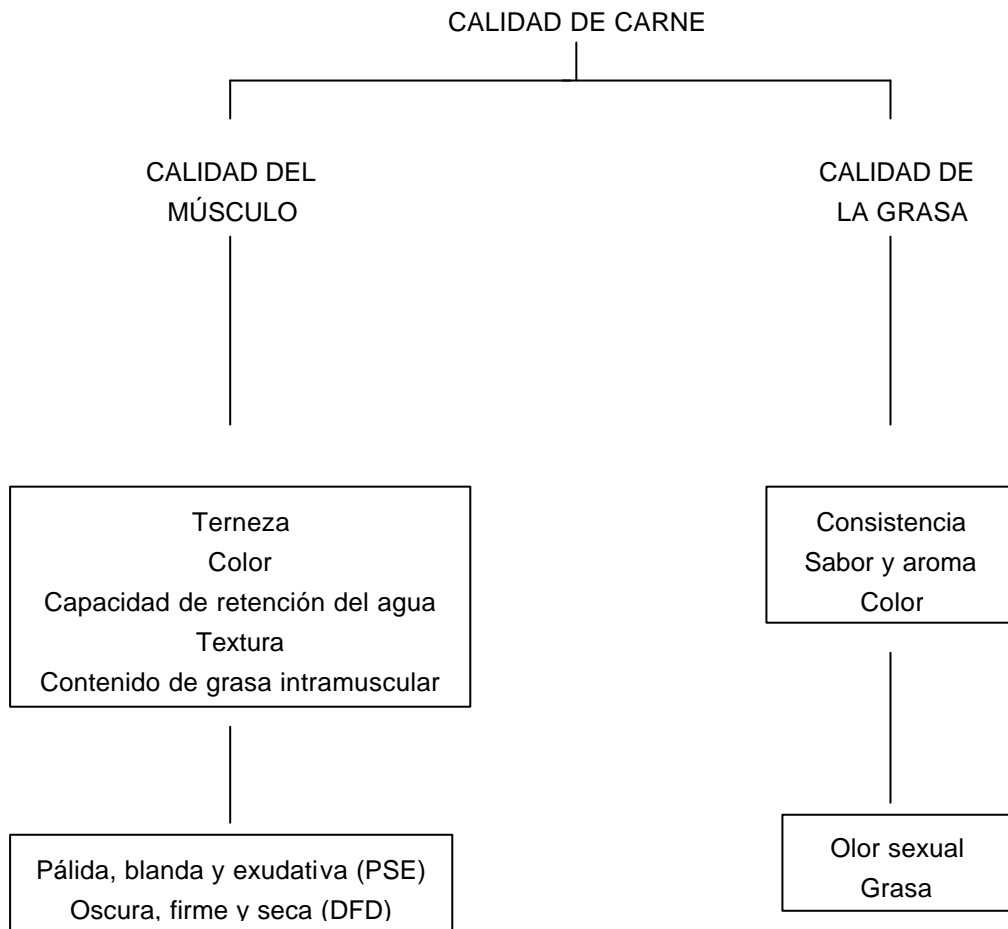


Figura 1.4. Aspectos que definen la calidad de carne

### 1.2.2. Alteraciones de la calidad de la grasa

El creciente rechazo que ha experimentado el consumo de productos excesivamente grasos, por su estrecha relación con las enfermedades cardiovasculares, ha originado un gran interés en la selección de canales con un elevado contenido magro, en especial en el sector porcino. No obstante, el espesor del tejido adiposo incide sobre el grado de insaturación y en la consistencia de la grasa. Cuanto menor es el espesor del tejido adiposo subcutáneo mayor es la relación ácidos grasos insaturados/ácidos grasos saturados, que influye de forma negativa en la consistencia de la grasa. Además, en la especie porcina el grado de insaturación disminuye con la edad y la proporción de ácidos grasos insaturados es menor en los machos castrados en comparación a los machos enteros.

La grasa destaca también por sus implicaciones nutricionales y dietéticas. El tejido adiposo y los lípidos neutros del tejido muscular constan mayoritariamente de triglicéridos y, en menor grado, de colesterol, ésteres de colesterol, monoglicéridos y diglicéridos. Todos estos compuestos, a excepción del colesterol, contienen ácidos grasos en su estructura molecular, que son de importancia capital en el metabolismo humano por su influencia en la salud. Los ácidos grasos más abundantes del tejido adiposo porcino son: oleico (40-50%), palmítico (20-25%), linoleico (10-20%), esteárico (10-15%) y en menor cantidad: palmitoleico (2-4%), linolénico (0,5-1%) y mirístico (0,2-0,3%) (Díaz, 1993). No obstante, diversos factores como la raza, la nutrición, el sexo y la localización anatómica modifican la composición en ácidos grasos.

La grasa influye sobre las características sensoriales de la carne. La oxidación de los lípidos incide negativamente sobre las propiedades sensoriales de los productos cárnicos. Los ácidos grasos que poseen insaturaciones en su estructura química (por ejemplo el linoleico y linolénico) son susceptibles a procesos oxidativos que conducen a la formación de peróxidos e hidroperóxidos, compuestos que desaparecen de forma gradual mientras se generan distintos productos volátiles y no volátiles: hidrocarburos, aldehidos, alcoholes, cetonas, ésteres y otros compuestos minoritarios (Kochhar, 1993).

La respuesta olfativa al aroma de un producto depende de la concentración e interacción de varias sustancias entre si y, por tanto, la obtención de cantidades pequeñas de productos de degradación pueden tener un efecto muy significativo sobre el olor de la grasa o de la matriz que la contenga, ya que la concentración

necesaria para generar una respuesta olfativa se mide en mg/quilo e, incluso, en ng/quilo.

La presencia de determinadas familias de compuestos se ha relacionado con el desarrollo de características sensoriales específicas como la rancidez (pentano, aldehidos) y los olores frutales (aldehidos, cetonas), entre otros. Estudios desarrollados en jamón curado (Berdagué y García, 1990; Berdagué y col., 1991a, b, 1993) han relacionado la presencia de determinados compuestos volátiles con el desarrollo de atributos sensoriales específicos, como por ejemplo: 2,3-butanodiona (mantequilla), 2-pentanona (rancio, plástico), 2-heptanona (rancio), nonanal (muy rancio) y 1-pentanol (frutal).

En otras ocasiones, la calidad de carne está afectada por el desarrollo de olores y sabores desagradables ocasionados por la acumulación de determinados compuestos en el tejido adiposo. El olor sexual es uno de los defectos sensoriales de mayor importancia socioeconómica originado por esta causa.

### 1.3. El olor sexual

#### 1.3.1. Ventajas e inconvenientes de la producción de cerdos enteros. Situación actual en algunos países europeos

El sacrificio de machos enteros es una práctica habitual en algunos países. Las ventajas que presenta la producción de machos enteros se han descrito en numerosos trabajos (Walstra, 1974; Fortin y col., 1983; Desmoulin, 1983; Patterson y Lightfoot, 1984; Cliplef y col., 1984; Knudson y col., 1985; Brennan y col., 1986; Stamer y col., 1993; Øverland y col., 1995; Bonneau, 1998), entre los que citaremos:

- Los costes de producción son menores, debido a la supresión de los gastos destinados a la realización de esta laboriosa práctica y a la disminución de la mortalidad de los animales a consecuencia de posibles infecciones o enfermedades. Además, los machos enteros necesitan un menor aporte alimentario y crecen con mayor rapidez (Fouler y col., 1981). Por ejemplo, el cociente costo/beneficio de la producción de carne de los cerdos enteros es aproximadamente de 6 euros sobre los castrados en las condiciones de producción danesas (Diestre, 1991).

- El tejido adiposo de cerdos enteros presenta una mayor proporción de ácidos grasos saturados y la carne de cerdo entero resulta más atractiva a los consumidores por su menor desarrollo de grasa intramuscular (Bonneau, 1998).
  
- Las canales de cerdos enteros presentan un mayor porcentaje de magro a consecuencia de una mejor eficiencia de conversión de los alimentos ingeridos (Squires y col., 1993b). La reducción del contenido magro de los cerdos castrados depende de la raza considerada. Según Desmoulin (1983) la reducción del contenido de magro es superior en la raza *Pietrain*, seguida de las razas *Landrace* Belga y *Large White*.
  
- La eliminación de nitrógeno por las heces de los machos enteros es inferior y, por tanto, se reduce la contaminación ambiental de purines.
  
- El bienestar de los animales es superior.

Sin embargo, la producción de cerdos enteros presenta algunos problemas asociados que afectan principalmente a la calidad de carne. Por una parte, el menor desarrollo de tejido adiposo puede considerarse un aspecto negativo en las canales genotípicamente magras, donde se observa un descenso de la cohesión entre la grasa subcutánea y el músculo. La composición en ácidos grasos difiere entre los machos enteros, los castrados y las hembras (Tabla 1.1). Los porcentajes de C18:1 y C18:2 son ligeramente superiores en los machos enteros en comparación al resto de grupos considerados, resultando una grasa con menor consistencia y más susceptible a la oxidación (Bonneau, 1998). Por otra parte, Desmoulin (1983) indicó que las diferencias entre la concentración de C18:2 de los machos enteros y castrados son más significativas en las razas *Pietrain* y *Landrace* Belga.

La producción de machos enteros se ha relacionado también con una mayor agresividad y actividad de los cerdos durante el transporte al matadero y en la espera antes del sacrificio, que puede ocasionar daños en la piel de los animales e infecciones, así como un incremento en la proporción de carnes DFD (Diestre, 1991; Bonneau, 1998).

No obstante, el mayor problema que condiciona la producción y comercialización de cerdos enteros entre los países miembros de la UE es el riesgo de que un porcentaje determinado de canales (5-10%, dependiendo del límite de aceptabilidad establecido) presenten el defecto sensorial denominado olor sexual o *Boar taint*, que provoca el rechazo de la carne y de los productos derivados por parte de los consumidores (Diestre y col., 1982).

La producción de machos enteros varía entre los diferentes países de la UE. Actualmente, la producción de cerdos enteros se ha generalizado en el Reino Unido, Irlanda, Portugal y España, donde representan más de un 90% de los animales sacrificados (Diestre, 1991). En Cataluña, se sacrifica aproximadamente una tercera parte de los cerdos de nuestro país y la mayor parte de los machos que llegan a los mataderos no han sido castrados (Diestre y col., 1982; Arpa y col., 1988). Sin embargo, la castración de los cerdos sigue practicándose en el resto de los países miembros de la UE y en Norteamérica. Recientemente, Dinamarca intentó la exportación de cerdos enteros, pero sus principales consumidores (Francia y Alemania) se opusieron rápidamente a su decisión (Bonneau, 1998).

La UE permite la libre circulación entre los países miembros de cerdos enteros cuyas canales no superen los 80 kilos, aunque la ausencia de olor sexual en las canales de mayor peso se debe confirmar mediante un método comprobado. La principal dificultad de este criterio es que el límite de 80 kilos no asegura la ausencia de este defecto sensorial en las canales. Al mismo tiempo, no existe un acuerdo general sobre el método de análisis que debe aplicarse, ya que hasta el momento, no se ha desarrollado ningún método completamente fiable que permita la determinación del olor sexual en la línea de sacrificio.



Tabla 1.1. Composición en ácidos grasos de la grasa dorsal de cerdo según el sexo y la castración

	Machos	Hembras	Castrados
% Insaturados	61,62 <sup>a</sup>	60,75 <sup>b</sup>	60,21 <sup>b</sup>
12:0	0,08	0,08	0,08
14:0	1,38	1,36	1,37
16:0	24,48	24,74	25,56
16:1	3,41	3,26	3,23
18:0	12,36	13,13	13,06
18:1	44,34	44,13	44,67
18:2	11,42	10,95	10,12
18:3	1,02	0,98	0,88
20:1	1,42	1,44	1,31
SATURADOS/INSATURADOS	1,58 <sup>a</sup>	1,52 <sup>ab</sup>	1,49 <sup>b</sup>

(Smithard y col., 1980)

### 1.3.2. Compuestos responsables del olor sexual

#### 1.3.2.1. El indol y escatol

El escatol (3-metilindol) y el indol son compuestos volátiles producto de la degradación anaeróbica del triptófano, aminoácido que proviene principalmente de la dieta o de segregaciones endógenas producidas por bacterias intestinales específicas y sensibles a la acción de los antibióticos. Las estructuras moleculares de estos compuestos se muestran en la Figura 1.5. Vold (1970), Walstra y Maarse (1970) y Hanson y col. (1980) asociaron la acumulación de escatol e indol en el tejido adiposo porcino al desarrollo del olor sexual, aunque se considera que la percepción del indol es menos ofensiva al olfato humano (Gibis y col., 1998).

Los mecanismos de formación y posterior acumulación de escatol e indol en el tejido adiposo se han descrito en numerosos estudios (Claus y col., 1994; Jensen y col., 1995a; Jensen y Jensen, 1998). El tracto intestinal porcino presenta una gran diversidad microbiológica y una densidad celular superior a las 10<sup>10</sup> células por gramo de masa. La mayoría de las bacterias intestinales presentes son estrictamente anaerobias y se estima que solamente un porcentaje inferior al 0,01% interviene en la síntesis de escatol e indol (Jensen y Jensen, 1993, 1998). Los productos principales de la fermentación microbiana gastrointestinal de los cerdos son los ácidos grasos de cadena corta, el lactato, amonio y gases de naturaleza diversa. Los microorganismos obtienen, en forma de ATP, la energía que utilizan para el crecimiento y mantenimiento de las funciones celulares. La formación de ATP, de ácidos grasos de cadena corta y de escatol son distintos parámetros que miden la actividad microbiana intestinal (Jensen y Jensen, 1998).

La degradación del isómero L de la molécula de triptófano genera la aparición de una molécula de indol y otra de ácido indol-3-acético, que posteriormente se metaboliza a escatol. Numerosos géneros bacterianos son capaces de sintetizar indol a partir de triptófano, pero la producción de escatol a partir de la descarboxilación del ácido indol-3-acético (Figura 1.6) se limita principalmente a bacterias específicas del género de los *Lactobacillus* y *Clostridium* (Claus y col., 1994; Jensen y col., 1995a).

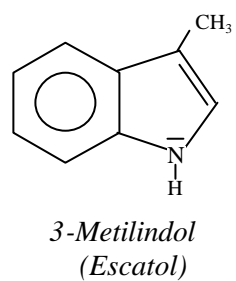
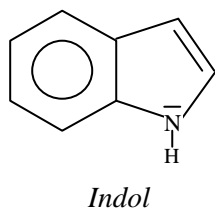
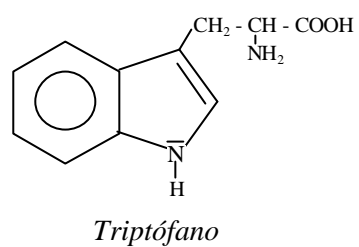


Figura 1.5. Estructuras moleculares del triptófano, indol y escatol

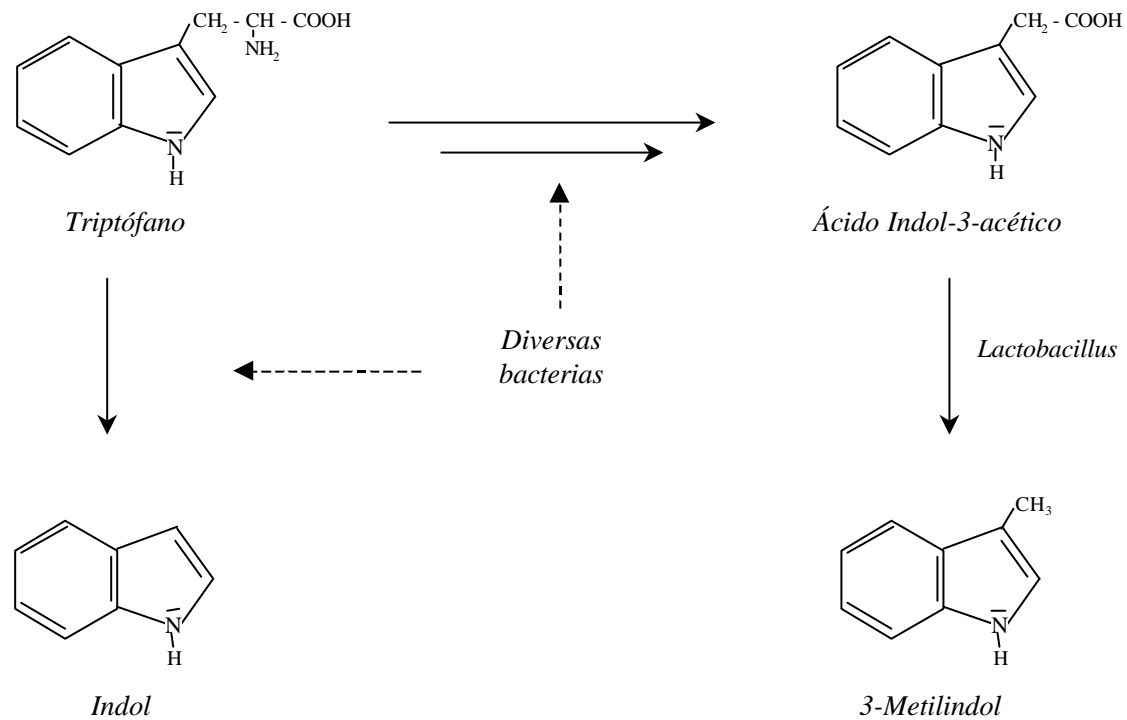


Figura 1.6. Biosíntesis del indol y del escatol a partir del aminoácido L-Triptófano

Jensen y Jensen (1993) estudiaron la producción *in vitro* de escatol en diferentes secciones del tracto gastrointestinal de los animales. Según estos autores, la producción de escatol se inicia en el ciego y se incrementa, progresivamente, en los distintos segmentos del intestino grueso, conforme avanza la ingesta y la fuente de energía (en forma de carbohidratos) representa un factor limitante de la fermentación microbiana. La producción diaria de escatol es variable y se sitúa entre 10-125 mg por día en un cerdo de 100 kilos de peso. La síntesis de escatol en el intestino grueso de los cerdos depende de la disponibilidad de sustrato y no se relaciona con la capacidad de síntesis de la microflora intestinal, ya que la adición de L-Triptófano o ácido indol-3-acético en el medio de incubación incrementa su producción.

La microflora intestinal sintetiza una mayor proporción de indol a expensas del escatol. La relación entre la producción de escatol e indol es aproximadamente de 1:2 cuando los cerdos reciben una dieta estándar, pero puede incrementarse hasta alcanzar una proporción de 1:4 cuando los animales reciben un suplemento de triptófano (Agergaard y Laue, 1998; Agergaard y col., 1998). La producción relativa de escatol e indol a partir de la degradación del triptófano también depende del pH intestinal (Jensen y col., 1995a; Jensen y Jensen, 1998). Estudios *in vitro* han mostrado que, a pH 5 y después de 24 horas de incubación, la síntesis de escatol e indol representa respectivamente un 80% y un 20% del triptófano añadido. No obstante, sólo un 15% del aminoácido se metaboliza a escatol a pH 8. De acuerdo con estos resultados, Claus y col. (1994) observaron que la adición de bicarbonato en la dieta disminuye la concentración de escatol en las heces y en el tejido adiposo.

Jensen y col. (1995a) evaluaron *in vitro* la capacidad de determinados compuestos derivados del triptófano de actuar como sustratos o inhibidores en la síntesis de indol y escatol. Las estructuras moleculares de estos compuestos se presentan en la Figura 1.7. Los resultados obtenidos por estos autores indican que los ácidos indol-3-láctico e indol-3-pirúvico se utilizan de sustratos en la síntesis de los compuestos indólicos estudiados. El ácido indol-3-pirúvico se metaboliza completamente en indol (15%), escatol (14%) y ácido indol-3-propiónico (43%) después de 24 horas de incubación, mientras que otras sustancias como el indol-3-aldehído, indol-3-carbinol, indol-3-acetato e indol-3-acetonitrilo inhiben la formación de escatol. Jensen y Jensen (1995, 1998) observaron que el indol-3-carbinol y el indol-3-

acetonitrilo no influyen en la degradación del triptófano, pero inhiben la formación de escatol por descarboxilación del ácido indol-3-acético. Sin embargo, la adición de estos compuestos inhibidores en la dieta de los cerdos no disminuye la concentración de escatol en las heces.

#### 1.3.2.1.1. Factores que determinan la producción de escatol

##### 1.3.2.1.1.1. Influencia de la dieta

La producción intestinal de escatol depende fundamentalmente de la composición de la dieta de los animales, que es la principal fuente de triptófano, aunque el turn-over de las propias células intestinales contribuye a su disponibilidad (Claus y col., 1994; Raab y col., 1995, 1997). Los factores principales que determinan la renovación de las células intestinales son la capacidad mitótica de las células y los efectos catabólicos de los glucocorticoides (Raab y col., 1995). Además, la presencia de las hormonas testiculares, superior en los machos enteros respecto a los machos castrados y las hembras, favorece la expresión de factores de crecimiento, como el IGF-1, que estimulan el turn-over de las células intestinales.

Bonneau y Desmoulin (1981) y Claus y col. (1994) observaron que una aportación adicional de triptófano en la dieta no influye sobre la producción de escatol, ya que este aminoácido se absorbe mayoritariamente en el intestino delgado. Jensen y col. (1995b) señalaron que la producción intestinal de escatol depende de la disponibilidad de triptófano que es consecuencia de la cantidad de aminoácido que llega al colon y de la actividad proteolítica de la microbiota intestinal.

La fermentación proteica en el intestino grueso está determinada por la digestibilidad de las proteínas en el intestino delgado, la actividad de los enzimas bacterianos y el tiempo de tránsito intestinal (Jensen y Jensen, 1998). Jensen y Jensen (1995) y Jensen y col. (1995b) observaron una concentración superior de escatol en el tejido adiposo de los animales alimentados con levadura de cerveza como única fuente proteica en comparación a los animales que se suministró caseína, proteína que presenta una elevada digestibilidad en el intestino delgado. De acuerdo con estos resultados, Lin y col. (1992) mostraron que la administración de dietas ricas en proteínas fácilmente fermentables disminuye la concentración plasmática de escatol.

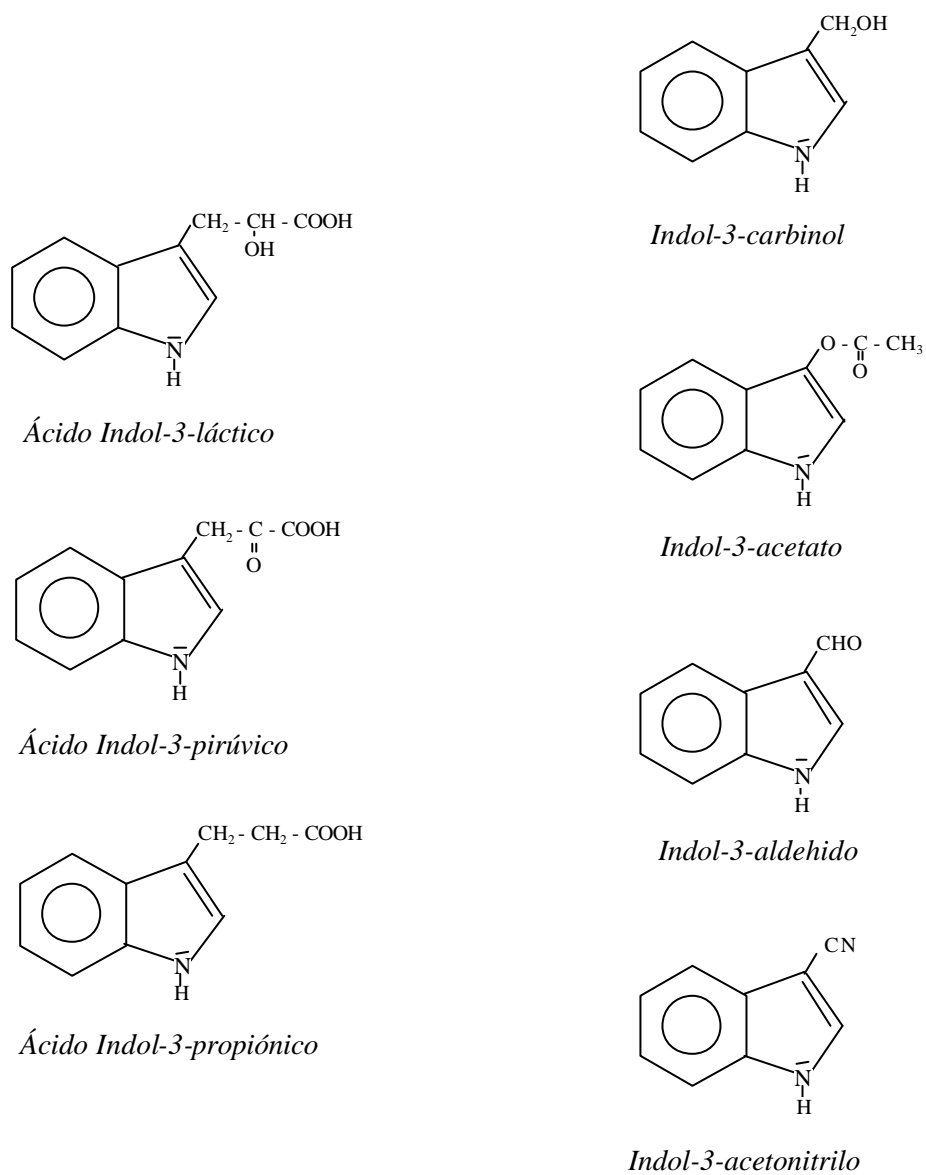


Figura 1.7. Compuestos indólicos evaluados *in vitro* por su capacidad de actuar de sustratos en la síntesis de escatol (Jensen y col., 1995a)

Por otra parte, la adición en la dieta de una fuente de energía alternativa fácilmente metabolizable por la microbiota intestinal, disminuye la producción de metabolitos producto de la fermentación proteica, aunque la cantidad de proteína que llega al colon sea elevada. La proporción de indol y escatol eliminada por las heces también aumenta significativamente al incrementar el contenido en fibra de la dieta mediante la utilización de carbohidratos no fermentables (remolacha) (Hawe y col., 1989), porque modifican el tiempo del tránsito intestinal y reducen la absorción del escatol a través de la pared intestinal (Jensen y Jensen, 1998). Agergaard y col. (1995) concluyeron que la producción de escatol disminuye significativamente al aumentar el contenido de fibra de la dieta.

A diferencia de los resultados citados, Lundström y col. (1988) señalaron que las dietas ricas en fibra estimulan la actividad proteolítica de la flora intestinal, observándose una mayor disponibilidad de triptófano. La adición a la dieta de un suplemento de carbohidratos fácilmente fermentables, como la pectina, reduce la actividad proteolítica de las bacterias intestinales por competencia de sustratos (Jensen y Jensen, 1995; Jensen y col., 1995b, 1997). Paralelamente, también se observa un incremento de la actividad microbiana, que origina un incremento de la producción de ácidos grasos de cadena corta, producto de la fermentación de los carbohidratos, y consecuentemente una disminución del pH intestinal que reduce la actividad de las proteasas intestinales (Jensen y Jensen, 1998). El incremento del crecimiento bacteriano favorece la incorporación del triptófano a la biomasa intestinal.

La concentración de escatol en el tejido adiposo también disminuye cuando los cerdos se mantienen en ayuno antes del sacrificio durante un periodo de doce horas (Kjeldsen, 1993). Del mismo modo, Kjeldsen (1993), Allen y col. (1997) y Andersson y col. (1997) indicaron que los animales alimentados mediante dietas líquidas presentan una concentración de escatol inferior a los animales que reciben dietas sólidas. Por otra parte, estudios preliminares han relacionado la disminución de la concentración de escatol en grasa con un aumento del consumo de agua (Kjeldsen, 1993).



#### 1.3.2.1.1.2. Influencia de los antibióticos

Diversos estudios han evaluado la influencia que ejerce sobre la producción de escatol la adición de determinados antibióticos en la dieta. Algunos de los compuestos estudiados (virginiamicina, bacitracina, avoparcina y espiramicina) disminuyen en un 80% la descarboxilación *in vitro* del ácido indol-3-acético a escatol, hasta situar los niveles de escatol en 10 µg/g (Jensen y Jensen, 1998). Sin embargo, estudios *in vivo* han indicado que su adición en la dieta de cerdos enteros durante periodos prolongados de tiempo no modifica la concentración de escatol en el tejido adiposo. Las discrepancias entre los resultados presentados se han relacionado con el desarrollo de cepas resistentes a la acción de los antibióticos o de cepas que poseen la capacidad de inactivarlos o degradarlos. No obstante, la adición de 50 µg/g de bacitracina (Hansen y col., 1995a) o virginiamicina (Jensen y Jensen, 1998) en la dieta de los cerdos durante la semana anterior al sacrificio disminuyó la concentración de escatol en grasa.

Por otra parte, la utilización de antibióticos como promotores del crecimiento es controvertida por su influencia sobre la salud humana y, en consecuencia, la UE sólo autoriza una adición máxima de 20 miligramos de bacitracina por kilogramo de pienso, cantidad inferior a la utilizada en el desarrollo de estos trabajos.

#### 1.3.2.1.2. Absorción y metabolismo del escatol

El escatol sintetizado en el intestino se absorbe y transporta, a través de la vena portal, hasta el hígado. El hígado metaboliza una parte del escatol absorbido y las moléculas restantes se transportan hasta los tejidos, a través de la vena hepática, donde se depositan. La concentración intestinal de escatol determina su velocidad de difusión a través de la pared intestinal. Estudios *in vivo* han mostrado que dietas ricas en fibra aumentan el volumen de la ingesta y la capacidad de retención de agua del intestino delgado y, por tanto, inducen una dilución del escatol producido y disminuyen su absorción intestinal (Jensen y Jensen, 1998; Agergaard y Laue, 1998). Otros factores que determinan la absorción del escatol son el tiempo de tránsito intestinal del alimento y la posible existencia de un elemento de unión específico para el escatol. Las moléculas de escatol que no se absorben se eliminan por las heces.

La vida media relativamente corta del escatol en sangre, aproximadamente 60 minutos, indica que se transporta rápidamente hasta el hígado para ser metabolizado (Agergaard y Laue, 1993; Friis, 1993). La capacidad metabólica del hígado determina la acumulación de escatol en el tejido adiposo. El metabolismo del escatol se ha estudiado ampliamente en caballos, vacas y cabras. Diversas vías metabólicas se relacionan con el metabolismo hepático del escatol (Bæk y col., 1997), como la formación de oxindoles y aminoacetofenonas, la oxidación del grupo metilo y las reacciones de hidroxilación del anillo en las posiciones 5, 6, 7 y de conjugación con grupos sulfato o con el ácido glucorónico (Figura 1.8).

Mediante técnicas de resonancia magnética nuclear y análisis de espectrometría de masas, Bæk y col. (1995, 1997) detectaron la presencia de dos metabolitos producto de la degradación hepática del escatol en plasma y orina de cerdos enteros y hembras: el 6-sulfatohidroxiescatol (MII) y el 3-hidroxi-3-metiloxindol (MIII). Babol y col. (1997a) describieron una concentración plasmática de MII significativamente superior en las hembras de la raza *Yorkshire* respecto a los machos enteros del mismo grupo. La naturaleza del compuesto MII, un derivado sulfato conjugado del 6-hidroxiescatol (pro-MII), sugiere que el mecanismo de degradación del escatol se produce en dos etapas: una primera mediante reacciones de oxidación y una segunda de conjugación catalizada por transferasas (Babol y col., 1997b). Un tercer metabolito, el 3-(N-acetilcisteina-S-il)-metilindol (MX), sólo se ha identificado en orina. Estos productos de degradación se transportan hasta los riñones y se eliminan por la orina. Las estructuras moleculares de estos compuestos se presentan en la Figura 1.9.

Estudios realizados en cerdos enteros han permitido observar que los animales que presentan una concentración baja de escatol en grasa también poseen una concentración plasmática del compuesto MII elevada, posiblemente relacionada con una rápida eliminación del escatol absorbido. No obstante, los animales que presentan una menor capacidad de metabolizar escatol producen una cantidad superior del metabolito MIII (Friis, 1995; Bæk y col., 1995, 1997). Estos resultados muestran la importancia de la vía metabólica que conduce a la formación del metabolito MII sobre la eliminación del escatol absorbido e indican que una deficiencia del metabolismo oxidativo sería la causa del mayor porcentaje de machos enteros que presentan una concentración elevada de escatol en grasa (Agergaard y Laue, 1993; Friis, 1995; Bæk y col., 1997).

La participación del sistema enzimático del citocromo P450 en la degradación del escatol en rumiantes, una potente pneumotoxina de esta especie, se ha descrito en estudios realizados anteriormente (Yost, 1989) y Friis (1995) sugirió que un sistema similar era responsable del metabolismo del escatol en el hígado porcino. Babol y col. (1997a, b) y Squires y Lundström (1997) indicaron que el citocromo P450IIE1 es responsable *in vitro* de la degradación hepática del escatol a 6hidroxiescatol (pro-MII), mientras que los niveles de escatol en el tejido adiposo están influidos por factores genéticos. Lundström y col. (1994) propusieron la existencia de un gen recesivo regulador del metabolismo hepático del escatol. La reducción de la expresión genética del citocromo P450IIE1 se ha relacionado con una disminución de la actividad metabólica del hígado porcino y posterior eliminación del escatol. Squires y Lundström (1997) correlacionaron negativamente actividades elevadas del citocromo P450IIE1 con concentraciones bajas de escatol en el tejido adiposo ( $r=-0,61$ ,  $p<0,001$ ), aunque estos autores también señalaron que la concentración de escatol en grasa depende de su producción y absorción intestinal cuando la actividad del citocromo P450IIE1 no es lo suficientemente elevada.

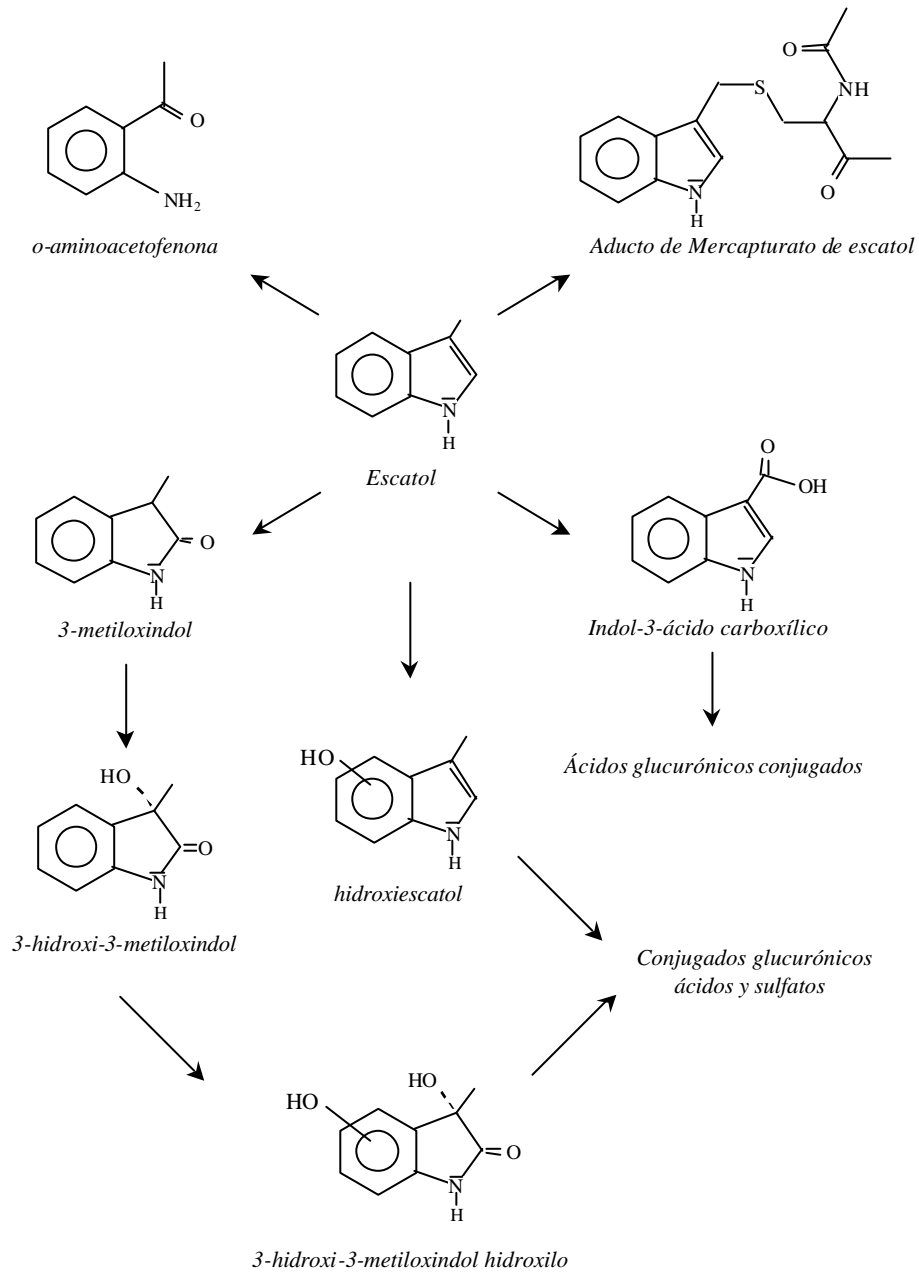
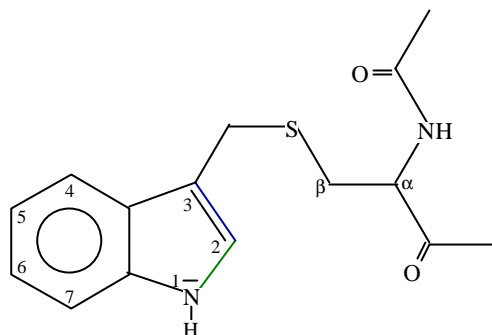
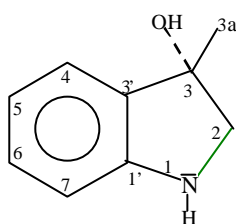


Figura 1.8. Metabolismo hepático del escatol

a)



b)



c)

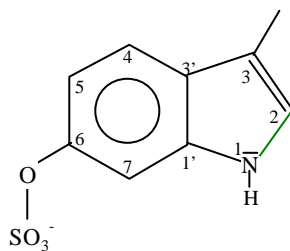


Figura 1.9. Estructuras moleculares de (a) 3-(N-acetilcisteina-S-il)-metilindol (MX); (b) 3-hidroxi-3-metiloxindol (MIII); (c) 6-sulfatohidroxiescatol (MII) (Bæk y col., 1997)

#### 1.3.2.1.3. Factores que determinan la acumulación de escatol e indol en el tejido adiposo

La acumulación de los compuestos indólicos en el tejido adiposo es un proceso reversible. La influencia de la dieta, de la composición y metabolismo de las bacterias intestinales y del metabolismo hepático se ha discutido anteriormente, pero existen factores ambientales, higiénicos y genéticos, además del sexo, que también influyen sobre la acumulación de escatol en grasa.

Un estudio realizado conjuntamente en 7 países de la UE (Dinamarca, Suecia, Alemania, Holanda, Reino Unido, Francia y España) ha mostrado que la concentración de escatol presenta una gran variabilidad entre animales (Bonneau, 1998; Walstra y col., 1999). Además, aunque no existen evidencias claras de la influencia del sexo sobre la producción de escatol, se observa que los cerdos enteros presentan una mayor concentración de escatol respecto a los machos castrados y las hembras (Hanson y col., 1980; Lundström y col., 1988; Bonneau y col., 1992a; Stamer y col., 1993; Moss y col., 1997) y la concentración de indol es superior en los cerdos castrados y las hembras que en los machos enteros (Hanson y col., 1980).

Los resultados obtenidos sugieren la existencia de una relación entre la presencia de los órganos sexuales masculinos y la concentración de indol y escatol en el tejido adiposo (Hanson y col., 1980; Moss y col., 1997). Claus y col. (1994) asociaron los efectos anabólicos de los andrógenos a un incremento del *turn-over* de las células intestinales en machos enteros. Friis (1993) observó que el metabolismo y la eliminación del escatol es superior en las hembras y Friis (1995) propuso que las hormonas sexuales masculinas, que también se metabolizan en el hígado, inducen la inhibición del sistema enzimático responsable del metabolismo hepático del escatol, concretamente del citocromo P450IIE1 (Babol y col., 1997b, c).

Algunos autores han relacionado el desarrollo sexual de los animales con la variabilidad que presenta la concentración de escatol en el tejido adiposo a un peso de sacrificio determinado. Bonneau y col. (1992a) y Andersson y col. (1997) observaron una correlación significativa entre el peso y tamaño de las glándulas bulbouretrales con la concentración de escatol en grasa y Lundström y col. (1988) propusieron que los niveles de escatol en el tejido adiposo están influidos por la síntesis testicular de esteroides.

Hansen y col. (1995b) relacionaron el incremento de la concentración plasmática de escatol con la producción de andrógenos en cerdos sacrificados a 100 kilos e indicaron que los animales con una mayor predisposición genética a depositar escatol presentan, a su vez, un mayor incremento de la concentración plasmática de escatol conforme se desarrollan sexualmente. Posteriormente, Hansen y col. (1997) evaluaron la concentración plasmática de escatol en función del peso de sacrificio (90-120 kilos). El contenido de escatol en plasma aumentó acusadamente durante el proceso de crecimiento y desarrollo sexual de los animales cuando los cerdos presentaron concentraciones elevadas de escatol en grasa en el momento del sacrificio, pero permaneció relativamente constante cuando los cerdos sacrificados presentaron un contenido bajo de escatol.

En desacuerdo con los resultados expuestos, Babol y col. (1996) mostraron que la concentración de escatol se correlaciona con el peso de las canales, pero que no se relaciona con el desarrollo sexual de los animales. Squires y Lou (1995) observaron niveles elevados de escatol al incrementar el peso de sacrificio de los cerdos de la raza *Hampshire* y Moss y col. (1997) concluyeron que, en el intervalo de 70-100 kilos de peso, la concentración de escatol es ligeramente superior en los animales de mayor peso. Von Seth y col. (1995) describieron diferencias significativas entre las concentraciones de escatol en grasa de animales sacrificados a 70 y 130 kilos de peso.

Recientemente, en un estudio realizado en el ámbito europeo, Walstra y col. (1999) mostraron que el contenido de escatol en grasa aumenta ligeramente con el peso de sacrificio de los cerdos. Sin embargo, LeDenmat y col. (1993) y Hennessy y col. (1995a) no observaron diferencias significativas entre la concentración de escatol de animales sacrificados a 90 o 105 kilos.

La influencia de las condiciones higiénicas sobre la concentración de escatol e indol en grasa se ha evaluado en numerosos trabajos (Kjeldsen, 1993; Hansen y col., 1993, 1994). Un estudio realizado en Dinamarca mostró que las concentraciones de los compuestos indólicos en las heces y en el ambiente de los corrales dependen de los sistemas de ventilación, de los tipos de suelo en los que descansan los cerdos, del espacio del que disponen y de la temperatura ambiental (verano/invierno) (Kjeldsen, 1993 y Hansen, 1998).

Hansen y col. (1993, 1994, 1995a) señalaron que los animales mantenidos en espacios reducidos y malas condiciones higiénicas presentan niveles de escatol e indol superiores en grasa. Las diferencias observadas se acentuaron durante los meses de verano (cuando la temperatura ambiental era superior a 22°C), pero disminuyeron significativamente cuando los animales se trasladaron a cuadras limpias una semana antes del sacrificio. Los resultados de estos autores evidenciaron que el escatol e indol presentes en las heces pueden absorberse a través de la piel o por inhalación a través de los pulmones y que la combinación de temperaturas ambientales elevadas junto a la producción de indol y escatol en las heces favoreció la transferencia de estos compuestos a la fase vapor, su absorción a través del sistema respiratorio y un incremento de su concentración en el tejido adiposo. Además, según cita Hansen (1998), el amonio y otros productos presentes en las heces afectan la actividad del sistema enzimático responsable de la degradación hepática del escatol. Por otra parte, Kjeldsen (1993) y Allen y col. (1997) señalaron que el tipo de suelo en el que se crían los cerdos influye sobre el contenido de escatol del tejido adiposo por su relación con la higiene de los corrales, especialmente, cuando los animales son alimentados mediante una dieta líquida.

El metabolismo y ciclo reproductivo de los cerdos están estrictamente relacionados con los periodos estacionales. Estudios recientes describen un efecto estacional de la concentración de escatol en grasa. Walstra y col. (1999) observaron que los animales sacrificados en invierno presentan niveles de escatol inferiores respecto a los animales sacrificados durante los meses de verano. Andersson y col. (1995a) simulaban artificialmente los distintos periodos estacionales y estudiaron el efecto que ejerce la cantidad de luz recibida por los animales en el desarrollo del olor sexual. Respecto a los animales del grupo control, la concentración de escatol en el tejido adiposo de los cerdos disminuyó al modificar artificialmente la cantidad de luz recibida (periodo otoñal o primaveral, respectivamente). De acuerdo con estos resultados, este grupo de muestras fue evaluado positivamente por un panel de consumidores. No obstante, Hansen y col. (1993) mostraron que la concentración de escatol en la grasa subcutánea es superior durante los meses de verano, aunque estos resultados se asociaron a una mayor transferencia del escatol a la fase vapor, debido a las elevadas temperaturas observadas en este periodo estacional.



Giersing y col. (1997) relacionaron la concentración plasmática de escatol con el estrés social que origina la presencia de un cerdo dominante en el grupo, debido a una posible relación entre el metabolismo del escatol y el de los esteroides, que en ambos casos se produce en el hígado (Babol y col., 1997c). Andersson y col. (1995b) observaron que la presencia de hembras reduce la concentración de escatol. Sin embargo, Allen y col. (1997) no observaron diferencias significativas en la evaluación del olor sexual de canales de cerdos criados en grupos mixtos, aunque si una mejor eficiencia de conversión.

Los resultados presentados indican que la concentración de escatol en el tejido adiposo depende principalmente de factores ambientales y de producción. Patterson y col. (1990) y Hennessy y col. (1995a) no describieron diferencias significativas entre las concentraciones de escatol de las razas estudiadas; aunque Lundström y Malmfors (1993) observaron que los cerdos de la raza *Landrace* Danesa presentan una mayor concentración de escatol que los cerdos de las razas *Yorkshire*, *Hampshire* o *Duroc* y sugirieron la existencia de un gen recesivo que controlaría la acumulación de escatol en el tejido adiposo y se expresaría fenotípicamente cuando se cumplieran unas determinadas condiciones ambientales (dieta, temperatura, estrés, etc.).

#### 1.3.2.2. Los esteroides

Craig y Pearson (1959) y Craig y col. (1962) demostraron que el defecto sensorial asociado al olor sexual (olor a orina) se localiza en el tejido adiposo, concretamente en la fracción insaponificable. Patterson (1968a) y Beerli y Sink (1971) aislaron e identificaron la feromona  $5\alpha$ -androst-16-en-3-ona ( $5\alpha$ -An) como la principal sustancia responsable del olor sexual en cerdos enteros. Esta hormona se sintetiza en los testículos, se almacena en las glándulas salivares o en el tejido adiposo y, posteriormente, se metaboliza en el hígado y se elimina por la orina. No obstante, la androstenona no explica completamente el desarrollo del olor sexual en la grasa de cerdo entero y, por tanto, no se descarta la contribución de otros compuestos al defecto sensorial (Patterson, 1967, 1968 a, b; Beerli y col., 1971; Bonneau, 1982; Brooks y Pearson, 1989).

La extracción de los compuestos volátiles de la grasa de cerdo y la aplicación de técnicas de cromatografía de gases acopladas a sistemas de análisis olfatorios permitieron aislar una sustancia que presenta un desagradable olor

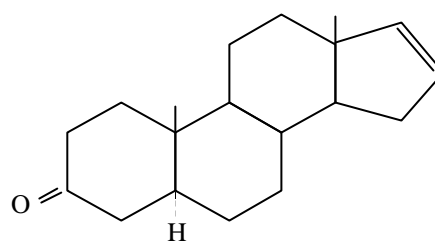
a orina y la espectrometría de masas determinó su fórmula ( $C_{19}H_{28}O$ ) y masa molecular (272) (Patterson, 1968a). La relación entre la presencia del defecto sensorial con la síntesis de las hormonas sexuales se estableció al observar la desaparición del olor sexual después de la castración de los animales. Sin embargo, la estructura de la testosterona ( $C_{19}H_{28}O_2$ ) posee un átomo de oxígeno de más que la estructura de la sustancia causante del defecto sensorial en grasa dorsal de cerdo entero y la androsterona ( $C_{19}H_{30}O_2$ ) los átomos que conforman una molécula de agua. Estos resultados mostraron que el átomo de oxígeno de la molécula estudiada requería la presencia de un doble enlace y constituía parte de un grupo carbonilo. Además, las características sensoriales del compuesto aislado desaparecieron al reaccionar con 2,4-dinitrofenilhidracina. El derivado de la testosterona más simple que cumplió estos requisitos es la androst-4-en-3-ona, pero su espectro de masas difirió sensiblemente del esperado.

Por otra parte, el análisis olfatorio confirmó que diversos monocetoandrostano y androstano, algunos relacionados con la biosíntesis de la androstenona, comparten las características sensoriales de la androstenona, aunque difieren en su intensidad. La  $5\alpha$ -androst-16-en-3-ona y la androst-3,5-dien-17-ona presentan un olor a orina más intenso que la  $5\beta$ -androst-16-en-3-ona. Otros compuestos que presentan un olor acentuado son:  $5\alpha$ -androstan-3-ona, androst-4-en-3-ona y androst-4,16-dien-3-ona. Sin embargo, la  $5\alpha$ -androstan-17-ona,  $5\alpha$ -androst-2-en-17-ona y  $5\alpha$ -androstan-11-ona no presentan ningún olor característico. Los resultados sensoriales indicaron que la presencia de aromas desagradables se relaciona con los compuestos que presentan un grupo carbonilo en la posición  $C_3$  y el hidrógeno de la posición  $C_5$  en orientación alfa si se halla presente (Patterson, 1968a; Brooks y Pearson, 1989).

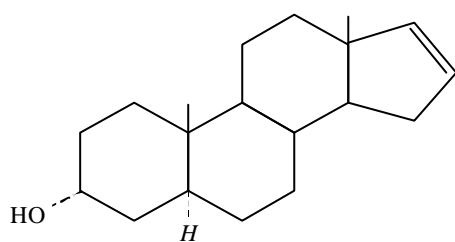
La posible contribución de los androstenoles ( $5\alpha$ -androst-16-en-3 $\alpha$ -ol y  $5\alpha$ -androst-16-en-3 $\beta$ -ol) y otros  $C_{19}$ - $\Delta^{16}$ -esteroides al olor sexual ha sido considerada por diversos autores (Patterson, 1968 a, b; Beerli y Sink, 1971; Beerli y col., 1971; Thompson y col., 1972; Bonneau, 1982; Brooks y Pearson, 1989). Patterson (1968b) identificó el compuesto ( $5\alpha$ -androst-16-en-3 $\alpha$ -ol) responsable del olor a almizcle (*musk-like*) asociado al olor sexual en las glándulas salivares de cerdos enteros adultos. Este mismo autor señaló que el aroma a almizcle se asocia a la grasa de cerdos jóvenes y que el olor a orina, característico de la androstenona, se impone en cerdos adultos.

El espectro de masas del compuesto identificado por Patterson determinó su peso molecular (274) y patrón de fragmentación, parecido al de la androstenona. La similitud entre los espectros de masas de ambas sustancias indicó que poseen una estructura química similar y la diferencia de dos unidades observada entre sus pesos moleculares sugirió que el compuesto aislado correspondía al alcohol secundario de la androstenona. Esta hipótesis se confirmó mediante la oxidación *in vitro* del alcohol aislado a la cetona correspondiente y en presencia de ácido crómico 8N (Patterson, 1968b). El epímero del compuesto identificado ( $5\alpha$ -androst-16-en- $3\beta$ -ol) también presenta olor a almizcle, aunque de menor intensidad. El espectro de masas de los dos androstenoles sólo difiere en la abundancia relativa del ion  $m/z$  241 (Patterson, 1968b). La baja concentración de estos compuestos en el tejido adiposo, próxima o inferior al límite de sensibilidad de los métodos cromatográficos desarrollados para su determinación, no ha permitido evaluar con exactitud su contribución al olor sexual (Bonneau, 1982).

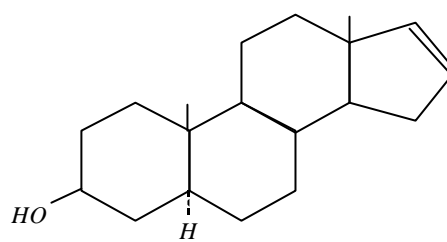
Las estructuras moleculares de la androstenona, de los androstenoles y de otros esteroides con posibles notaciones sensoriales se presentan en la Figura 1.10 y Figura 1.11.



*5α-androst-16-en-3-ona*



*5α-androst-16-en-3α-ol*



*5α-androst-16-en-3β-ol*

Figura 1.10. Estructuras moleculares de la androstenona y de los androstenoles

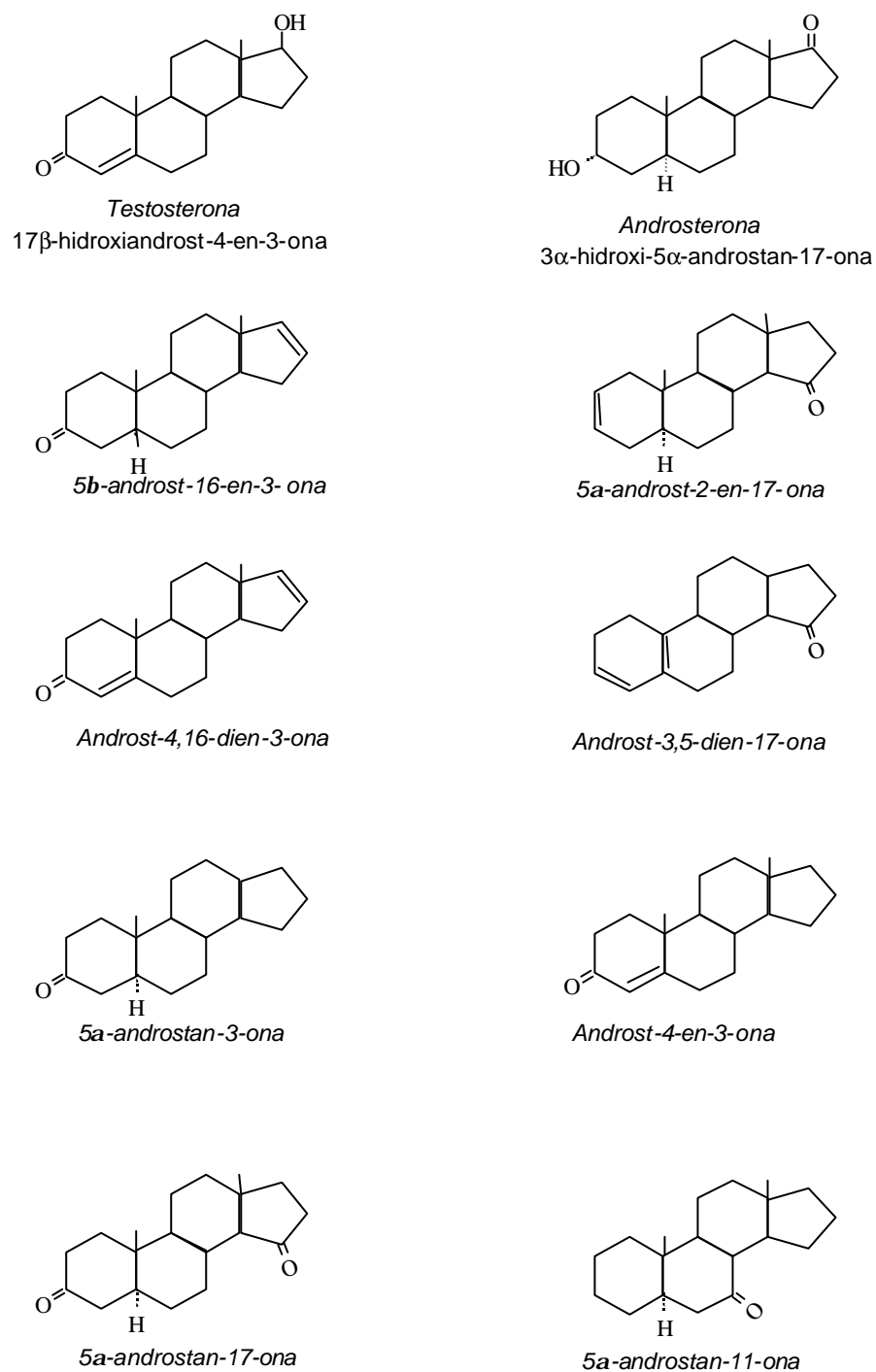


Figura 1.11. Estructuras moleculares de diversos C<sub>19</sub>-Δ<sup>16</sup>-esteroides relacionados con el metabolismo de la androstenona

#### 1.3.2.2.1. Biosíntesis de la androstenona y otros esteroides

La biosíntesis de la androstenona y, de los esteroides en general, se produce en las células intersticiales de los testículos (células de *Leydig*) y está controlada por el sistema neuroendocrino. Diversos factores sociales y ambientales (estrés, temperatura, nutrición) provocan una variación de la secreción hormonal del sistema hipotalámico y, consecuentemente, de la hormona luteneizante (LH) que estimula la síntesis de los esteroides en las células de *Leydig* (Claus y col., 1994).

El precursor común de la biosíntesis de los corticoides (mineralocorticoides y glucocorticoides), andrógenos, estrógenos y  $C_{19}-\Delta^{16}$ -esteroides es la pregnenolona, que se sintetiza a partir del colesterol mediante una serie de reacciones de oxidación y rotura de enlaces que se presentan en la Figura 1.12 (Gower, 1969; Gower y Katkov, 1972; Brooks y Pearson, 1986).

a- Los glucocorticoides afectan principalmente al catabolismo de proteínas, lípidos y carbohidratos. Sus efectos metabólicos son antagonistas a los de la insulina e inducen un aumento en la concentración de aminoácidos libres, ácidos grasos y glucosa en sangre. Los glucocorticoides naturales más activos son: la cortisona, el cortisol, la 11-dehidrocorticosterona y la corticosterona (Brooks y Pearson, 1986).

b- Los mineralocorticoides controlan el transporte de electrolitos y la distribución de agua en los diferentes tejidos. Entre sus principales efectos se observa un incremento de la absorción renal de iones sodio y cloruro y un descenso de la actividad de las glándulas sudoríferas y salivares. La aldosterona es el mineralocorticoide fisiológico más potente.

Los corticoesteroides y los mineralocorticoides comparten la misma vía metabólica. Las rutas de síntesis de estos compuestos se presentan en la Figura 1.13.

Los corticoides se sintetizan a partir de la progesterona o de la  $17\alpha$ -hidroxipregnenolona (productos derivados de la pregnenolona) por acción de enzimas específicos (oxigenasas y deshidrogenasas) que requieren la presencia de NADPH como cofactor y generan la adición de grupos hidroxilo o ceto en las posiciones C-11, C-17 o C-21. En general, la hidroxilación en la

posición C-21 es necesaria para que la molécula final presente actividad mineralocorticoide y glucocorticoide, mientras que los esteroides con un grupo hidroxilo en la posición C-17 presentan principalmente actividad glucocorticoide.

c- Las hormonas sexuales (andrógenos y estrógenos) regulan la manifestación de las características sexuales y controlan el ciclo reproductivo de los animales. Además, según cita Gower (1969) los andrógenos promueven el metabolismo anaeróbico proteico, incrementando la transcripción del DNA a RNA y las actividades enzimáticas de la RNA polimerasa en el núcleo celular y de la aminoaciltransferasa en los ribosomas (Brooks y Pearson, 1986). Las hormonas sexuales incrementan la velocidad de respiración oxidativa, la cantidad de mitocondrias y la síntesis de membranas mitocondriales e inducen un aumento de la masa muscular y una mejor eficiencia de conversión del alimento ingerido (Brooks y Pearson, 1986).

Las rutas de biosíntesis de los andrógenos se han descrito ampliamente en la bibliografía (Gower, 1969; Brooks y Pearson, 1986). La testosterona, principal hormona sexual masculina, se sintetiza en las células intersticiales de los testículos (células de *Leydig*) a partir de dos rutas biosintéticas alternativas (vía  $\Delta^4$  y  $\Delta^5$ ) que utilizan la pregnenolona como precursor común. La pregnenolona se transforma a progesterona mediante una deshidrogenasa específica en la vía  $\Delta^4$  y, posteriormente, se reduce a  $17\alpha$ -hidroxiprogesterona. Este intermediario se metaboliza por acción de una desmolasa a androstenediona, que se transforma en testosterona previa reducción del grupo cetona de la posición C17. La vía alternativa (vía  $\Delta^5$ ) supone la hidroxilación de la pregnenolona mediante la acción de la  $17\alpha$ -hidroxilasa. La oxidación de la hidroxipregnenolona, catalizada por una desmolasa, produce dehidroepiandrosterona (DHA) que posteriormente se metaboliza a androstenediona.

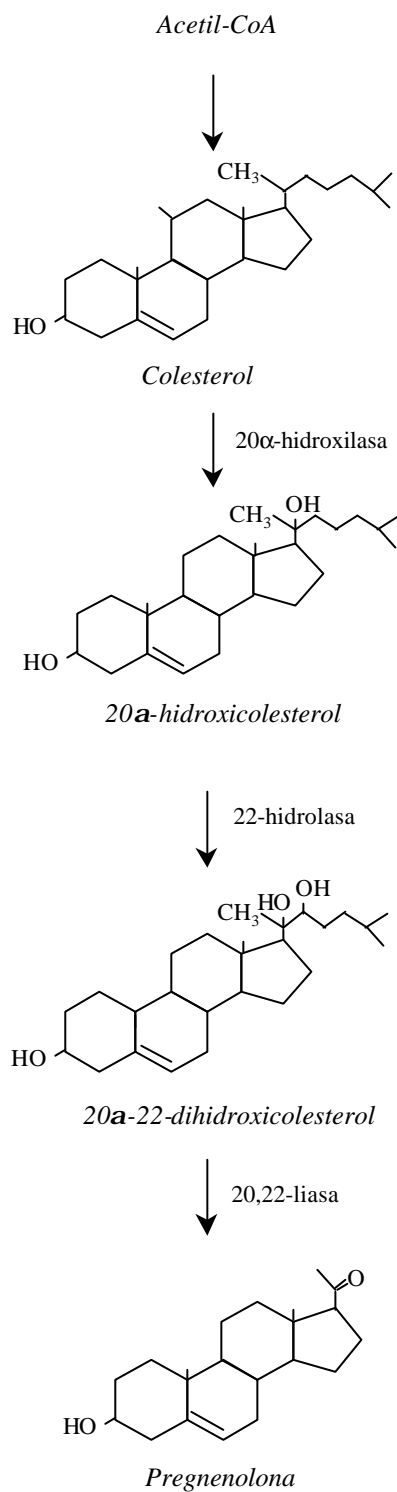


Figura 1.12. Biosíntesis de la pregnenolona, precursor común de los esteroides, a partir de acetil-CoA



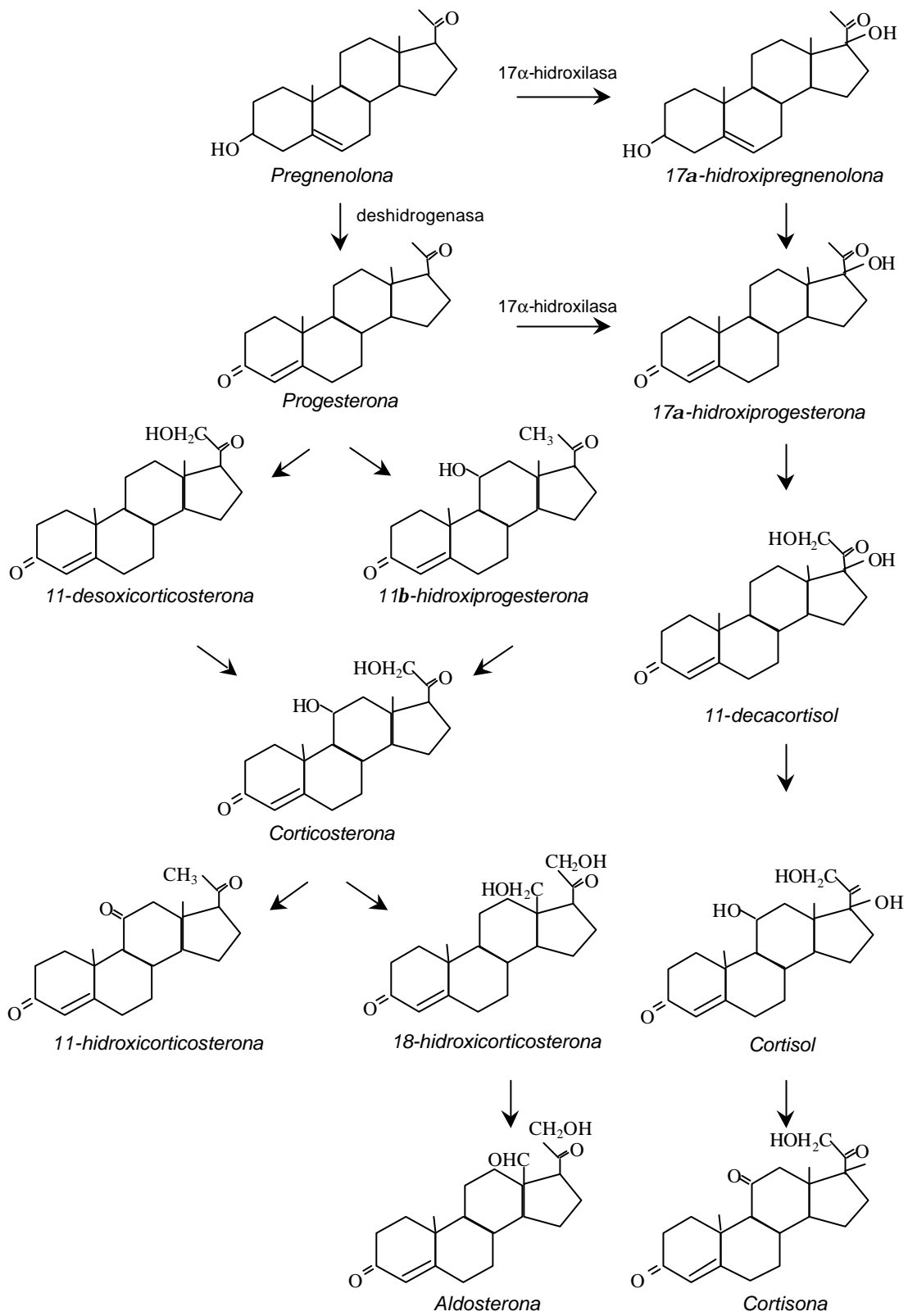


Figura 1.13. Rutas de biosíntesis de los glucocorticoides y mineralocorticoides

La importancia relativa de cada una de estas vías, esquematizadas en la Figura 1.14, depende de la especie que se considere. La vía  $\Delta^5$  tiene un mayor peso en la especie humana y porcina, mientras que en los ratones se da mayor importancia a la vía  $\Delta^4$  (Gower, 1969; Louveau y col., 1991).

La testosterona y la  $\Delta^4$ -androstenediona son los precursores de la síntesis de estrógenos en los testículos, ovarios y glándulas adrenales. La principal hormona sexual femenina es el  $17\beta$ -estradiol, que mantiene un equilibrio metabólico constante con la estrona. La hidroxilación del carbono situado en la posición  $C_{19}$  de la testosterona y androstenediona induce la formación de la 19-hidroxitestosterona y 19-hidroxi-4-androstenediona, respectivamente. La oxidación de estos compuestos en la posición  $C_3$  y la posterior pérdida del grupo aldehído conduce a la síntesis del  $17\beta$ -estradiol y de la estrona (Figura 1.14).

*d- Los  $C_{19}$ - $D^{16}$ -esteroides.* La pregnenolona es el precursor común de los esteroides, aunque las hormonas sexuales y los  $C_{19}$ - $\Delta^{16}$ -esteroides se sintetizan a través de vías metabólicas separadas y no relacionadas.

El 5,16-androstadien- $3\beta$ -ol es el primer esteroide sintetizado a partir de la pregnenolona (Gower, 1969). El enzima responsable de esta reacción, la andien- $\beta$ -sintetasa, se localiza principalmente en la fracción microsomal de los testículos y requiere la presencia de NADPH y oxígeno molecular como cofactores (Bonneau, 1982; Brooks y Pearson, 1986). Este metabolito se convierte en la 4,16-androstadien-3-ona por acción de un enzima  $NAD^+$  dependiente (5-en- $3\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa-4,5-isomerasa). La androstadienona también se sintetiza directamente a partir de la progesterona, aunque esta ruta es de menor importancia en los testículos de la especie porcina (Gower, 1969; Bonneau, 1982; Brooks y Pearson, 1986). Por último, la androstadienona se reduce a androstenona por acción de un enzima NADPH dependiente, la 4-en- $5\alpha$ -reductasa. En general, la biosíntesis de la androstenona es diferente en el cerdo joven y adulto. En los animales adultos la 5,16-androstadien- $3\beta$ -ol se sintetiza directamente a partir de la pregnenolona, pero en los cerdos jóvenes se forman previamente dos intermediarios: la  $17\alpha$ -hidroxipregnenolona y la  $3\beta$ -hidroxipregna-5,16-dien-20-ona (Gower, 1969; Bonneau, 1982).

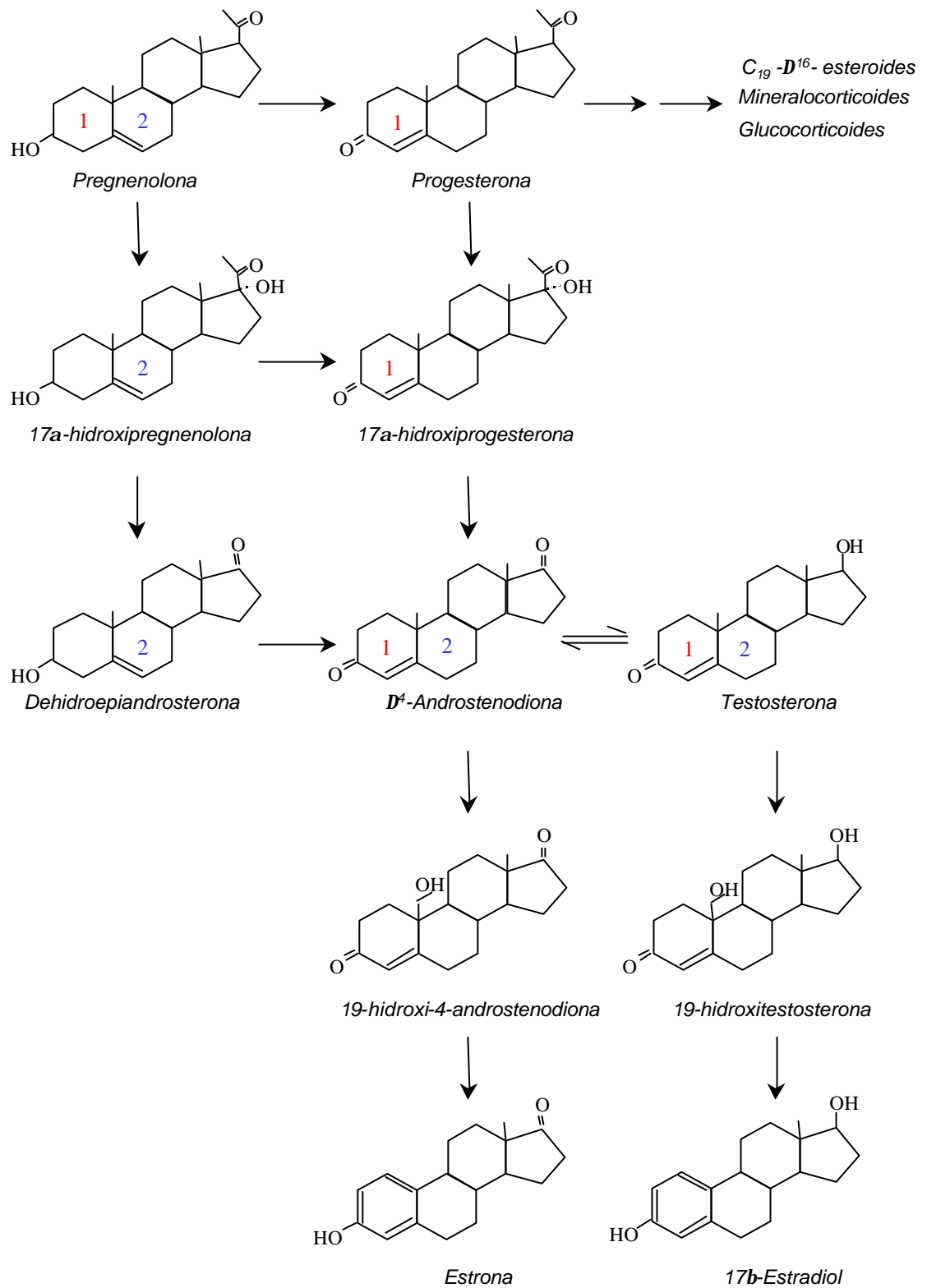


Figura 1.14. Rutas de biosíntesis de las hormonas sexuales en el cerdo adulto. (1) ruta  $\Delta^4$ , (2) ruta  $\Delta^5$

Los enzimas 3 $\alpha$ - y 3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasas son responsables de la reducción de la androstenona en los correspondientes androstenoles (5 $\alpha$ -androst-16-en-3 $\alpha$ -ol y 5 $\alpha$ -androst-16-en-3 $\beta$ -ol). La reducción de la 5 $\alpha$ -androst-16-en-3-ona a 5 $\alpha$ -androst-16-en-3 $\alpha$ -ol es NADPH dependiente, mientras que la presencia del cofactor NADH es necesaria para la formación del 5 $\alpha$ -androst-16-en-3 $\beta$ -ol. El producto de la reducción de la androstenona es una mezcla de los dos androstenoles, aunque se observa que el isómero beta predomina en los testículos del cerdo (Bonneau, 1982; Brooks y Pearson, 1986). Posteriormente, los androstenoles se conjugan con grupos sulfato o con el ácido glucorónico y se liberan a la vena espermática como compuestos derivados, a diferencia de la androstenona que se libera de forma libre (Bonneau, 1982; Brooks y Pearson, 1986). El esquema de la vía de biosíntesis de estos compuestos se presenta en la Figura 1.15.

Los C<sub>19</sub>- $\Delta$ <sup>16</sup>-esteroides sintetizados en los testículos se transportan a través del sistema circulatorio hasta las glándulas salivares que metabolizan los C<sub>19</sub>- $\Delta$ <sup>16</sup>-esteroides, aunque no presentan la capacidad de sintetizar el 5,16-androstadien-3 $\beta$ -ol a partir de la pregnenolona. La saliva de los cerdos enteros presenta una concentración significativa de androstenona y androstenoles, principalmente del isómero alfa, en una relación de 1:20 (Patterson, 1968b; Booth y col.,1986). Brennan y col. (1986) mostraron que la relación entre la concentración de androstenona y la concentración suma de 5 $\alpha$ -androst-16-en-3 $\alpha$ -ol y 5 $\alpha$ -androst-16-en-3 $\beta$ -ol en grasa subcutánea es constante y, aproximadamente, de 2 a 1. Los resultados expuestos indican que la acumulación de estos compuestos en el tejido adiposo sigue unas proporciones constantes, así como la proporción de androstenona liberada del tejido adiposo y metabolizada a androstenoles.

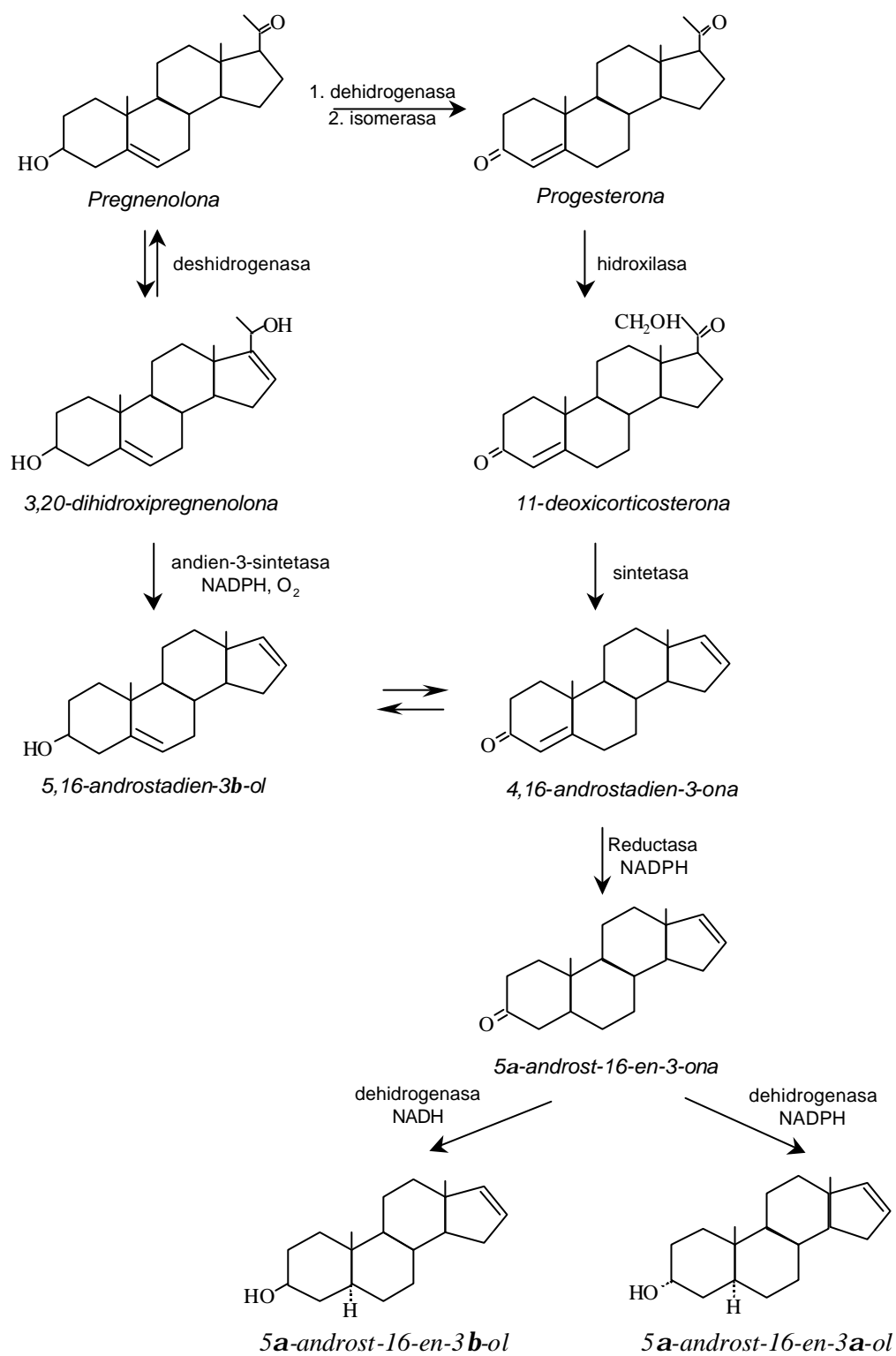


Figura 1.15. Ruta de biosíntesis de los C<sub>19</sub>-Δ<sup>16</sup>-esteroides

Estudios recientes han relacionado la velocidad de producción de  $C_{19}\text{-}\Delta^{16}$ -esteroides en los testículos y su posterior acumulación en el tejido adiposo con la actividad enzimática del citocromo B5, uno de los componentes del sistema enzimático responsable de la biosíntesis de androstenona: la andien- $\beta$ -sintetasa (Meadus y Squires, 1993). Edwards y col. (1997) mostraron la presencia de dos isoformas del citocromo B5 de diferente peso molecular en los testículos de cerdos enteros, aunque sólo la isoforma de bajo peso molecular se correlaciona con la velocidad de producción de los esteroides ( $r=0,615$ ) y con su concentración en el tejido adiposo ( $r=0,721$ ). Estos autores indicaron que las isoformas del citocromo estudiado no se correlacionan con la síntesis de las hormonas sexuales. Estos resultados sugieren que la producción de 16-androsteno esteroides puede reducirse sin alterar la biosíntesis de las hormonas sexuales mediante la selección genética de animales que presenten una menor expresión de la isoforma de bajo peso molecular del citocromo B5. Paralelamente, el desarrollo del mapa del genoma porcino ha permitido estudiar la relación entre determinadas zonas cromosómicas y el desarrollo de características conformacionales de la canal, de gran importancia económica. En este sentido, Bidanel y col. (1997) observaron una relación genética entre el contenido de androstenona en grasa y un marcador genético presente en el cromosoma 7. Estos autores sugirieron que la expresión del gen codificado en este cromosoma se relaciona con la abundancia de la isoforma de bajo peso molecular del citocromo B5 implicada en la biosíntesis de la androstenona.

#### 1.3.2.2.2. Metabolismo y eliminación de la androstenona

La androstenona, una vez sintetizada, se libera a la sangre a través de la vena espermática, se metaboliza en el hígado y se elimina por la orina y las heces o se transporta hasta las glándulas salivares y tejido adiposo, donde se almacena debido a sus características lipofílicas (Bonneau, 1982). La concentración plasmática de androstenona y  $5\alpha$ -androst-16-en- $3\alpha$ -ol es del orden de 10-60 ng/ml, mientras que las concentraciones de estos compuestos en las glándulas salivares se sitúan entre 5-10  $\mu\text{g/g}$  y 30-80  $\mu\text{g/g}$ , respectivamente. Bonneau y Terqui (1983) evaluaron la velocidad de

eliminación de la androstenona en cerdos de 100 quilos de peso mediante técnicas radioactivas. La concentración plasmática de androstenona radioactiva disminuyó rápidamente a consecuencia de su depósito en el tejido adiposo o de la síntesis de los androstenoles (libres o conjugados) y otros posibles compuestos polares no identificados (androstanotrioles, monocetoandrostanodioles o dicetoandrostanoles) que, por sus características, constituirían la principal forma de eliminación de la androstenona a través de la orina. Además, una parte de la radioactividad se eliminó por las heces y el resto permaneció en el tejido adiposo, ya que se estima que la vida media de la androstenona, en cerdos de pesos similares, es de 4-14 días (Bonneau y col., 1982a).

La androstenona se metaboliza en el hígado. Su incubación en microsomas hepáticos genera la aparición de dos metabolitos separados cromatográficamente e identificados, según su tiempo de retención (Babol y col., 1997c). La relación entre el metabolismo hepático del escatol y los niveles de androstenona en grasa es consecuencia de la influencia que la presencia de las hormonas sexuales masculinas (sintetizadas en los testículos) ejerce sobre el metabolismo oxidativo del escatol (Babol y col., 1997c).

La acumulación de androstenona en el tejido adiposo es un proceso reversible que disminuye acusadamente cuando los animales han sido castrados. Bonneau y col. (1982a) observaron que los niveles de androstenona en grasa dependen de su catabolismo y posterior eliminación después de la castración, pero no están relacionados con su velocidad de liberación del tejido adiposo. Booth y col. (1986) correlacionaron significativamente la concentración de androstenona en plasma y en grasa ( $r=0,73$ ). La variabilidad en la vida media de la androstenona en grasa obedece a la diferente velocidad de eliminación de la androstenona plasmática que presentan los animales. De acuerdo con estos resultados, Cliplef y col. (1985) señalaron que la concentración de androstenona en el tejido adiposo y en el plasma se mantiene constante durante las seis semanas siguientes a la castración y disminuye hasta niveles no detectables durante las seis semanas siguientes. Sin embargo, durante este periodo de tiempo, un 27,5% de los niveles iniciales de androstenona y  $5\alpha$ -androst-16-en-3 $\alpha$ -ol, determinados de forma conjunta, permanecen en las glándulas salivares (Grinwich y col., 1988).

La androstenona depositada en el tejido adiposo se libera al sistema circulatorio durante la estimulación sexual y se transporta hasta las glándulas salivares donde se reduce a  $5\alpha$ -androst-16-en-3 $\alpha$ -ol. Una proteína de unión específica, la *pheromaxein*, transporta los esteroides desde la circulación sanguínea hasta las glándulas salivares, donde su concentración puede superar los 100  $\mu\text{g/g}$  (Brooks y Pearson, 1986; Squires y col., 1993b).

Según cita Bonneau (1982), numerosos estudios han mostrado la relevancia del olfato durante el comportamiento sexual de los cerdos. La androstenona y el androstenol liberados a través de la saliva actúan de feromonas, pues son compuestos fácilmente perceptibles por los demás miembros del grupo.

#### 1.3.2.2.3. Factores que influyen en la concentración de androstenona en el tejido adiposo

La concentración de androstenona en el tejido adiposo de las canales porcinas procedentes de animales sacrificados a los pesos habituales del mercado presenta una gran variabilidad. Según Bonneau (1998) y Walstra y col. (1999), el porcentaje de animales (de un total de 4.293 machos enteros procedentes de 6 países de la Unión Europea) que presentaron una concentración de androstenona inferior a 0,20  $\mu\text{g/g}$ , entre 0,20-0,50, 0,50-1,0, 1,0-2,0, 2,0-5,0 y superior a 5,0  $\mu\text{g/g}$  fue de un 7, 24, 28, 22, 14 y 5 %, respectivamente, mientras que un 98% de las hembras evaluadas presentaron una concentración de androstenona inferior a 0,1  $\mu\text{g/g}$ . La variabilidad descrita en el contenido de androstenona se relaciona con la capacidad de síntesis de la  $5\alpha$ -An y con el desarrollo sexual de los animales, ambos determinados genéticamente. Sin embargo, la influencia que ejercen los factores ambientales, nutricionales y sociales sobre la producción de androstenona también se han descrito en numerosos trabajos (Bonneau y col., 1982b; Patterson y Lightfoot, 1984; DeBrabander y col., 1985; Von Seth y col., 1995; Walstra y Garssen, 1995; Hennessy y col., 1997).

##### 1.3.2.2.3.1. Influencia del peso y de la edad de sacrificio

El peso de las canales y el desarrollo sexual de los animales se han relacionado con la intensidad de síntesis de androstenona y del resto de esteroides testiculares (andrógenos y estrógenos) responsables de la mejor eficiencia de conversión de los cerdos enteros (Bonneau y col., 1982a; Louveau y col., 1991; Walstra y Garssen, 1995). Las vías



metabólicas implicadas en la síntesis de estos compuestos comparten los mismos mecanismos de regulación y resulta difícil disminuir la producción de androstenona sin modificar la producción de las hormonas sexuales.

Bonneau y col. (1982b) y Babol y col. (1996) observaron un ligero incremento de la concentración de androstenona entre los 70-170 días de vida de los cerdos, mientras que la concentración de testosterona se mantuvo constante. La concentración de ambos compuestos se incrementó de forma espectacular a partir de los 200 días y decreció a partir de los 250 días de vida de los animales. El aumento significativo de la concentración de androstenona se produjo a diferentes edades o pesos y favoreció una elevada variabilidad en las concentraciones de  $5\alpha$ -An en el tejido adiposo. La relación positiva entre el contenido de androstenona y el peso de sacrificio de los animales ( $p=0,002$ ;  $R^2=0,396$ ) descrita por Berg y col. (1993) indica la importancia de producir cerdos a pesos de sacrificio bajos para evitar el desarrollo del olor sexual asociado a la presencia de androstenona. En relación con este resultado, Patterson y Lightfoot (1984) y Booth y col. (1986) indicaron que el porcentaje de canales de cerdos enteros que presentan una concentración de androstenona superior a  $1 \mu\text{g/g}$  aumenta de forma considerable cuando el peso de sacrificio supera los 100 kilos y Hennessy y col. (1995a) observaron unas concentraciones de androstenona superiores en cerdos sacrificados entre 107-144 kilos ( $1,30 \mu\text{g/g}$ ) respecto a los animales sacrificados entre 90-107 kilos ( $0,93 \mu\text{g/g}$ ). Von Seth y col. (1995) describieron un incremento del porcentaje de canales que presentan niveles de androstenona superiores a  $2 \mu\text{g/g}$  al incrementar el peso de sacrificio de 60 a 90 kilos. Recientemente, Walstra y col. (1997, 1999) señalaron que la concentración de androstenona aumenta ligeramente con el peso de sacrificio de los animales y disminuye con el porcentaje de magro de las canales. En desacuerdo con estos resultados, LeDenmat y col. (1993) no observaron diferencias significativas en la concentración de androstenona de animales sacrificados entre 90-105 kilos.

Los cerdos alcanzan la madurez sexual en los primeros 6-7 meses de vida, aunque se ha observado que diversos factores, como la genética, la nutrición o el medio ambiente influyen en su desarrollo sexual (Andersson y col., 1997). Booth y col. (1986) describieron concentraciones de androstenona superiores a  $1 \mu\text{g/g}$  en cerdos sacrificados a pesos inferiores a los 100 kilos y relacionaron el mayor tamaño de las glándulas salivares

y bulbouretrales de estos animales con una madurez sexual precoz. De acuerdo con estos resultados, Babol y col. (1996) correlacionaron significativamente ( $p < 0,01$ ;  $r = 0,60$ ) el tamaño de las glándulas bulbouretrales con el grado de olor sexual detectado por un panel de especialistas.

#### 1.3.2.2.3.2. Influencia de los factores ambientales

La duración relativa de los periodos de luz y oscuridad (fotoperiodos) a los que se someten los cerdos influye sobre la concentración de androstenona. El cerdo doméstico actual procede del cerdo salvaje europeo (*Sus Scrofa*), cuyo metabolismo y reproducción depende de factores estacionales. Según citan Andersson y col. (1997), la síntesis de esteroides es menor en verano y la reducción en invierno de las horas de luz estimula la entrada en celo de las hembras. Andersson y col. (1995a, 1997) concluyeron que el porcentaje de magro de las canales y el tamaño de los testículos y glándulas bulbouretrales es inferior en los animales sometidos a variaciones artificiales del fotoperiodo.

Claus y col. (1994) indicaron que la concentración de androstenona en grasa aumenta conforme disminuye la cantidad de luz recibida o al aplicar programas de luz artificial que simulan la estación invernal. Walstra y Garssen (1995) observaron que la concentración de  $5\alpha$ -An en el tejido adiposo es superior durante el periodo primaveral ( $1,07 \pm 1,02 \mu\text{g/g}$ ) respecto al periodo otoñal ( $0,82 \pm 0,93 \mu\text{g/g}$ ). No obstante, Andersson y col. (1995a) no describieron diferencias significativas entre la concentración de androstenona de los animales control y los animales sometidos a cambios en el régimen de luz, aunque los miembros de un panel sensorial consideraron que el nivel de olor sexual era superior en los animales no tratados. Posteriormente, Andersson y col. (1997) observaron que los cerdos que reciben variaciones en la cantidad de luz durante su desarrollo sexual presentan una menor concentración de androstenona respecto a los cerdos control.

#### 1.3.2.2.3.3. Influencia de la alimentación

La alimentación ejerce una influencia menor sobre la concentración de androstenona, a diferencia del escatol (apartado 1.3.2.1.1.1). Claus y col. (1994) concluyeron que los cerdos que reciben suplementos energéticos en la dieta presentan un mayor desarrollo testicular y un aumento de la concentración de androstenona en el tejido adiposo. Por otra parte, Von

Seth y col. (1995) y Øverland y col. (1995) describieron que una alimentación intensiva y un aumento en el aporte de lisina reducen la concentración de androstenona en el tejido adiposo porcino.

#### 1.3.2.2.3.4. Influencia de las relaciones entre los miembros de un grupo

La presencia de otros cerdos en el grupo durante el periodo de crecimiento y desarrollo se ha relacionado con el comportamiento, la agresividad y la concentración de androstenona en grasa. Según cita Bonneau (1982), los animales que crecen en grupos individuales y que no permanecen en contacto con las hembras presentan una concentración de androstenona inferior respecto a los cerdos que permanecen en grupos numerosos. Posteriormente, Patterson y Lightfoot (1984) observaron que la diferencia entre las concentraciones de androstenona de cerdos criados en grupos mixtos o individuales es más significativa en animales sacrificados a pesos superiores a los 100 kilos.

La androstenona presente en la saliva actúa de feromona y reduce la agresividad de los cerdos jóvenes. La concentración de androstenona se ha relacionado con la actividad sexual de los animales y su jerarquía dentro del grupo en diversos estudios. La agresividad que muestran los cerdos ante las luchas, ya sean luchas internas o respuestas a situaciones extrañas, provoca un aumento rápido de la concentración de androstenona en el tejido adiposo. Claus y col. (1994) y Giersing y col. (1997) observaron que los cerdos dominantes de un grupo presentan unos niveles de androstenona y un desarrollo de los órganos sexuales superiores. Estos parámetros no disminuyen en el resto de los machos subordinados, sino que parece ser que la presencia de un cerdo dominante estimula la producción de androstenona en los demás miembros del grupo.

#### 1.3.2.2.3.5. Influencia de los factores genéticos

Desmoulin (1983), DeBrabander y col. (1985) Meadus y Squires (1993) y Sellier y col. (1993) relacionaron la concentración de androstenona en el tejido adiposo porcino con la raza de cerdo evaluada. Bonneau (1982) indicó que la raza *Landrace* Belga presenta una mayor concentración de androstenona en grasa respecto a las razas *Large White* o *Yorkshire*, aunque los cerdos de la raza *Pietrain* presentan unos niveles de androstenona superiores a los cerdos de la raza *Landrace* Belga. En Canadá, donde los cerdos se sacrifican a un peso aproximado de 100 kilos, la concentración de  $C_{19}-\Delta^{16}$ -esteroides en las glándulas salivares

fue mayor en los cerdos de la raza *Duroc* respecto a los cerdos de la raza *Landrace* y *Yorkshire* (Squires y Lou, 1995), mientras que Hennessy y col. (1995a) describieron resultados similares en muestras de grasa dorsal.

### 1.3.3. Métodos analíticos

En la actualidad, el principal problema relacionado con la producción y comercialización de cerdos enteros reside en la dificultad de establecer, en la línea de sacrificio, un método de clasificación basado en la determinación de la concentración de androstenona y escatol de las canales. Estos métodos analíticos deben ser rápidos, precisos y sencillos para permitir el análisis de un gran número de muestras en tiempo real.

La principal desventaja de los métodos cromatográficos desarrollados para la determinación de los compuestos asociados al olor sexual radica en la necesidad de realizar laboriosos pasos de extracción y purificación, que limitan el número de muestras a procesar en intervalos de tiempo cortos. No obstante, estas metodologías son las más apropiadas para ser aplicadas en el laboratorio para evaluar la influencia de diversos factores (castración, alimentación, inmunización, raza, peso) sobre la concentración de escatol y androstenona en grasa. Además, permiten evaluar la presencia de otras sustancias que puedan contribuir al desarrollo del olor sexual en muestras de grasa que presentan defecto sensorial y concentraciones bajas de escatol y androstenona.

La prueba más difundida para determinar la presencia de olor sexual en las canales de machos enteros consiste en calentar la muestra de grasa con la punta de un soldador eléctrico (Jarmoluk y col., 1970) y, posteriormente, los miembros de un panel test evalúan sensorialmente el humo desprendido. El principal inconveniente de este método, además de la imprecisión del procedimiento analítico, es su subjetividad. Los resultados obtenidos dependen de la sensibilidad de los panelistas para detectar el olor sexual, que disminuye con el número de muestras y varía entre días (Squires y col., 1991). Además, la evaluación sensorial está determinada por la relación entre las concentraciones de escatol y androstenona de la fase vapor y la fase sólida, debido a las diferentes presiones de vapor que presentan estos dos compuestos (García-Regueiro y col., 1995).

### 1.3.3.1. Métodos de análisis rápidos

El desarrollo de un método on-line que permita la determinación rápida y precisa de la concentración de escatol y androstenona en muestras de grasa y la clasificación de las canales con olor sexual en la línea de sacrificio ofrecería grandes ventajas económicas para la comercialización y producción de cerdos enteros.

#### 1.3.3.1.1. Métodos colorimétricos

##### 1.3.3.1.1.1. Indol y Escatol

En la actualidad, el único método desarrollado que permite la determinación de la concentración de escatol en muestras de grasa en la línea de sacrificio es el método colorimétrico desarrollado en Dinamarca por Mortensen y Sørensen (1984). La principal ventaja de este método consiste en que es un sistema totalmente automatizado, que permite analizar aproximadamente un total de 200 muestras por hora. El escatol se extrae mediante una mezcla de tampón 0,1M Tris (pH 7,5)-Acetona (1:3) y la intensidad del derivado formado por reacción con el 4-dimetilaminobenzaldehído se determina espectrofotométricamente a 580 nm. Los resultados obtenidos se expresan en equivalentes de escatol, debido a que la reacción no es específica y el indol u otros compuestos relacionados pueden interferir y conducir a valores erróneos. El límite de detección del método es de 0,02-0,04 equivalentes de escatol en muestras de grasa dorsal y la recuperación, evaluada mediante muestras de grasa fortificadas con cantidades conocidas de escatol, se aproxima al 100% (Mortensen y Sørensen, 1984).

El desarrollo de la metodología presenta algunos puntos críticos. El reactivo de derivatización debe mantenerse a temperaturas lo suficientemente bajas para que sea estable y el tiempo de reacción no debe superar los 180 segundos. Además, el procedimiento es sensible a la calidad de la acetona utilizada y la determinación del derivado obtenido, que presenta un bajo coeficiente de extinción molar a 580 nm, requiere la utilización de cubetas con un paso de luz elevado (Hansen-Møller y Andersen, 1994).

En Dinamarca se considera que el compuesto que contribuye de forma más significativa al desarrollo del olor sexual es el escatol y las canales se clasifican en los mataderos mediante la determinación de los equivalentes de escatol, aunque también se han desarrollado métodos cromatográficos

que permiten la determinación específica de la concentración de escatol e indol en muestras de grasa. La determinación del contenido de escatol mediante HPLC (Hansen-Møller, 1992; Hansen-Møller y Andersen, 1992, 1994) se correlacionó con los equivalentes de escatol determinados espectrofotométricamente (Mortensen y Sørensen, 1984) ( $r=0,973$ ,  $y=1,0743 x - 0,0671$ ). Sin embargo, el método colorimétrico sobrestima el contenido de escatol, especialmente cuando su concentración en el tejido adiposo es baja. Según estos resultados, las concentraciones de indol y escatol obtenidas por HPLC permiten predecir los equivalentes de escatol, pero pueden obtenerse resultados erróneos cuando la concentración de indol es superior a la de escatol (Hansen-Møller y Andersen, 1992, 1994; Tuomola y col., 1996b, c).

Boutten y col. (1995) adaptaron y simplificaron el procedimiento de extracción del ensayo colorimétrico en flujo continuo desarrollado por Mortensen y Sørensen para la determinación de escatol en grasa. Las muestras de grasa se fundieron directamente en un microondas y, posteriormente, una alícuota del extracto se homogeneizó en 4 ml de una mezcla de tampón 0,1M Tris (pH 7,5)-acetona (1:3). El nuevo método desarrollado por estos autores es reproducible y sensible, pues permite la detección de 0,065  $\mu\text{g/g}$  de escatol y, además, incrementaron hasta 400 el número de extracciones por hora (Boutten y col., 1995).

#### 1.3.3.1.1.2. Androstenona

Diversos métodos colorimétricos también se han desarrollado para la determinación de la concentración total de los  $\text{C}_{19}\text{-}\Delta^{16}$ -esteroides en grasa y glándulas salivares. Squires (1990) y Squires y col. (1991, 1993a) desarrollaron un procedimiento basado en la reacción colorimétrica de los esteroides con el resorcialdehído y el ácido sulfúrico en ácido acético glacial. La reacción se desarrolla a 100°C durante 10 minutos y la absorbancia, posteriormente, se mide a 590 nm. Sin embargo, el colesterol, que presenta una mayor concentración en grasa que los esteroides, puede reaccionar con los reactivos e interferir en los resultados. La eliminación del colesterol mediante la utilización de columnas de afinidad es económicamente desfavorable y representa un incremento del tiempo de análisis.

La evaluación del olor sexual basada en el contenido de androstenona y 5 $\alpha$ -androst-16-en-3 $\alpha$ -ol de las glándulas salivares ofrece diversas ventajas

respecto a la utilización de muestras de grasa. Las glándulas salivares se obtienen fácilmente durante la inspección de las canales en el matadero, que posteriormente pueden venderse sin ninguna manipulación ni deterioro. La concentración total de 16-androstenos en las glándulas salivares es de 10 a 100 veces superior a la concentración de androstenona en grasa. Además, el método colorimétrico aplicado puede simplificarse debido a la menor concentración de colesterol en estas muestras y, por tanto, su eliminación mediante la utilización de columnas de afinidad no es necesaria.

Squires (1990) y Squires y col. (1991, 1993a) indicaron que la concentración total de esteroides en grasa se correlaciona significativamente con la concentración total de esteroides en glándulas salivares ( $r=0,71$ ). Por otra parte, Squires y col. (1991) y Babol y col. (1996) mostraron que la concentración de 16-androstenos esteroides en las glándulas salivares se correlaciona con la clasificación sensorial de las canales según un panel de especialistas. Otros autores indicaron que la concentración total de esteroides en las glándulas salivares se correlaciona con la concentración de androstenona en grasa (Booth y col., 1986), aunque Grinwich y col. (1988) señalaron que en los cerdos castrados esta correlación no es significativa.

#### 1.3.3.1.2. Métodos inmunológicos: RIA y ELISA

Los métodos inmunoquímicos desarrollados para la determinación de androstenona, como el RIA y el ELISA, se basan en la obtención de anticuerpos que se unen de forma específica a los compuestos a analizar. La cantidad de anticuerpo unido se mide espectrofotométricamente mediante reacciones enzimáticas que producen un producto coloreado en los métodos ELISA o mediante radioisótopos en los métodos RIA. Sin embargo, la utilización de radioisótopos limita su aplicación en la línea de sacrificio.

Las metodologías inmunológicas se utilizan como métodos de *screening* para descartar las canales de cerdos enteros que presentan olor sexual porque son sensibles y permiten el análisis de un número elevado de muestras. No obstante, la disponibilidad de los anticuerpos de androstenona es crítica y los anticuerpos obtenidos carecen de la especificidad suficiente, ya que establecen reacciones cruzadas con otros esteroides (testosterona, androstenodiona,  $5\alpha$ -androst-16-en-3 $\alpha$ -ol,  $5\alpha$ -androst-16-en-3 $\beta$ -ol, 4,16-

androstadien-3-ona, 5,16-androstadien-3 $\beta$ -ol) que afectan la precisión de los resultados (DeBrabander y col., 1986; Claus y col., 1988). Así, los resultados positivos obtenidos mediante estas metodologías se comprueban mediante análisis cromatográficos específicos para la androstenona y los androstenoles.

Claus (1974) y Andresen (1974, 1975) desarrollaron un método radioinmunológico (RIA) para la determinación de androstenona en grasa y plasma mediante la utilización de anticuerpos procedentes de conejos. La sensibilidad del ensayo fue de 50 picogramos de androstenona. Bicknell y Gower (1976) realizaron mediante radioinmunoensayo la determinación de 5 $\alpha$ -An-3 $\alpha$ -ol en plasma y Grinwich y col. (1988) determinaron la concentración total de 16-androstenos esteroides en glándulas salivares. En general, los métodos radio-inmunoquímicos son más rápidos y sensibles que los métodos cromatográficos, pero la utilización de materiales radioactivos encarecen los análisis y no permiten su aplicación en la línea de sacrificio (DeBrabander y col., 1986; Abouzied y col., 1990).

Intervet Internacional B. V. (Holanda) desarrolló un *kit* comercial, basado en la metodología ELISA, que permite la determinación de androstenona en muestras de grasa. Lundström y Malmfors (1985) correlacionaron significativamente ( $r=0,71$ ) la concentración de androstenona determinada mediante el método ELISA con los resultados obtenidos por un panel sensorial. Sin embargo, la aplicación de los *kits* comerciales del método ELISA para la determinación de androstenona y posterior clasificación de las canales de cerdos enteros en la línea de sacrificio no es factible, ya que un elevado porcentaje de muestras presenta concentraciones distintas a las establecidas en la recta de referencia o recta patrón (Hansen-Møller y Andersen, 1994). Además, la aplicación *on-line* de esta metodología analítica requiere estudiar y ajustar los parámetros de incubación para que la unión entre la androstenona y los anticuerpos utilizados se establezca en el menor tiempo posible.

Claus y col. (1988) desarrollaron un ensayo inmunoenzimático para la determinación de la concentración de androstenona en muestras de grasa dorsal. En este estudio, la extracción de la androstenona del material lipídico es crítica porque depende del coeficiente de reparto de la 5 $\alpha$ -An entre los disolventes utilizados (hexano y metanol). Además, el procedimiento de extracción es laborioso e implica tiempos de análisis largos y pérdidas en la recuperación de la 5 $\alpha$ -An. De acuerdo con los



resultados previos, Claus y col. (1997a) describieron que la extracción de la androstenona en metanol y a temperatura ambiente permite eliminar parte del material lipídico y disminuir el tiempo de análisis sin afectar la exactitud del método.

Boutten y col. (1994) desarrollaron un ensayo inmunoenzimático que permite la determinación de androstenona en el intervalo de concentraciones de 0,02 a 10 µg/g. DeBrabander y col. (1986) describieron una buena correlación entre los resultados obtenidos mediante ELISA y cromatografía de gases ( $r=0,881$ ), aunque el método cromatográfico permite determinar concentraciones inferiores de androstenona. La comparación del método ELISA con el método cromatográfico desarrollado por Hansen-Møller (1994) mostró una correlación significativa entre los resultados de ambas metodologías analíticas ( $r=0,979$ ).

Abouzied y col. (1990) describieron la obtención de un anticuerpo monoclonal específico contra la androstenona y determinaron la concentración total de  $C_{19}-\Delta^{16}$ -esteroides en plasma y suero mediante esta técnica inmunoenzimática. La sensibilidad, reproducibilidad, simplicidad en la preparación de las muestras y los costes mínimos de los reactivos utilizados permiten la aplicación del método en el *screening* de las canales en la línea de sacrificio. Sin embargo, no se ha establecido la relación que existe entre la concentración de los compuestos responsables del olor sexual en sangre y en el tejido adiposo (Abouzied y col., 1990). Andresen (1975) y Booth y col. (1986) observaron que niveles de esteroides en suero superiores a 15 ng/µl se corresponden con niveles elevados de androstenona en grasa. De acuerdo con estos resultados, Tuomola y col. (1996b, c) describieron una correlación significativa ( $r=0,70$ ) entre la concentración de androstenona en grasa y suero.

Los enzimas utilizados para la determinación de la androstenona por ELISA presentan una señal de amplificación elevada que depende del tiempo y de la temperatura de incubación, de las condiciones físico-químicas que se establecen durante la incubación del sustrato y de la presencia de compuestos interferentes e inhibidores. Tuomola y col. (1996a) desarrollaron un ensayo inmunofluorométrico para la determinación de la concentración de androstenona en suero y grasa de cerdos enteros. En este método la androstenona se liga con europio y se forma un complejo que presenta una respuesta fluorescente elevada y constante. Hansen-Møller y Andersen (1994), Mågård y col. (1995) y Tuomola y col. (1996a) observaron

una buena correlación entre los resultados obtenidos mediante este método inmunológico y métodos de análisis por cromatografía de gases.

#### 1.3.3.1.3. Pirólisis

La pirólisis es una técnica que permite la caracterización rápida de materiales de naturaleza diversa a través de su volatilización y fragmentación térmica. La principal ventaja de esta técnica es la información que ofrece sobre los componentes de la muestra, compuestos volátiles y no-volátiles, que resulta difícil de obtener mediante las metodologías actuales de *Head Space*. La pirólisis se acopla a la espectrometría de masas (Py-MS) y los compuestos generados por pirólisis se analizan mediante espectrometría de masas en el modo de impacto electrónico y, posteriormente, se identifican mediante la comparación y estudio de sus espectros de masas. El tiempo de análisis es relativamente corto y su aplicación permite la caracterización de diferentes productos como petróleo, polímeros, alimentos o incluso efectuar tipologías de microorganismos. No obstante, la principal desventaja de esta metodología es la menor cantidad de muestra aplicada y, por tanto, requiere que los productos sean lo suficientemente homogéneos para que los análisis sean representativos.

La capacidad de la pirólisis para clasificar las canales de cerdos enteros que presentan el riesgo de desarrollar olor sexual se ha evaluado recientemente. Berdagué y col. (1995, 1996) clasificaron muestras de grasa dorsal con concentraciones de androstenona inferiores a 0,7 mg/kg o superiores a 1,6 mg/kg con una precisión de un 97,5%, utilizando análisis discriminante y de un 100%, utilizando redes neuronales artificiales. No obstante, los resultados obtenidos hasta el momento son preliminares y los estudios deben ampliarse con un mayor número de muestras que presenten un mayor intervalo de concentraciones de androstenona e incluir factores como el genotipo, el régimen alimentario o los pesos de sacrificio que determinan la variabilidad animal. La evaluación de la aplicación de esta metodología en la clasificación de canales también requiere determinar su capacidad de discriminar según el contenido de otros compuestos que puedan contribuir al desarrollo del olor sexual, como el escatol.

#### 1.3.3.1.4. Extracción de líquidos en el estado supercrítico acoplada a la espectrometría de masas (SFE/GC-MS)

El desarrollo en los últimos años de las técnicas de extracción de líquidos en el estado supercrítico (SFE) es una alternativa interesante para la extracción rápida de los compuestos relacionados con el olor sexual. La aplicación de esta metodología en el campo alimentario se ha descrito en el análisis de pesticidas, nitrosaminas, sulfamidas y colesterol, entre otros compuestos. El dióxido de carbono en estado supercrítico es el medio de extracción más utilizado porque es inerte y no presenta toxicidad. Tuomola y col. (1997, 1998) obtuvieron rendimientos de extracción aceptables de la androstenona mediante CO<sub>2</sub> puro en estado supercrítico. No obstante, el CO<sub>2</sub> es muy apolar y la elución de compuestos de características más polares presenta dificultades. La adición de modificadores polares a la fase móvil, como el metanol, aumenta el rendimiento de análisis de estos compuestos. La recuperación de los compuestos extraídos del solvente supercrítico (CO<sub>2</sub>) se efectúa mediante la disminución de la presión del fluido que modifica su capacidad de solvatación.

La solubilidad de la grasa en el líquido supercrítico se controla a través de la temperatura y la densidad. La optimización de las condiciones de extracción (temperatura, presión, densidad, flujo, cantidad de muestra) evita la coextracción de los lípidos de la grasa y facilita la transferencia de masa de las sustancias a estudiar. Zabolotsky y col. (1995) evaluaron la influencia de la temperatura y del tiempo sobre la extractibilidad de la androstenona y del escatol en muestras de grasa fortificadas mediante un sistema de extracción supercrítico en modo estático. La recuperación de la 5 $\alpha$ -An aumentó hasta un 97% al incrementar la temperatura de extracción hasta 40°C y, al mismo tiempo, permitió una reducción del tiempo de extracción a 5 minutos. No obstante, la extractibilidad del escatol no mejoró en estas condiciones y la recuperación obtenida fue de un 65% a pesar de prolongados tiempos de extracción.

La extracción estática a 60°C durante 10 minutos seguida de una extracción en dinámico a 40°C aumentó la solubilidad de la grasa en el estado supercrítico, favoreció una distribución más uniforme de la muestra dentro de los viales de extracción y facilitó la transferencia de la androstenona y de los androstenoles a la corriente de CO<sub>2</sub> (Mågård y col., 1995). Además, la optimización del tamaño de muestra y del flujo de CO<sub>2</sub> permitió reducir el tiempo de extracción a 20 minutos. Los resultados del método desarrollado

se correlacionaron con los obtenidos mediante un método radioinmunológico (Claus, 1974) y un método de cromatografía líquida (Hansen-Møller, 1994). El límite de detección de la androstenona descrito por Mågård y col. (1995) mediante SFE fue de 0,05 µg/g y es comparable al obtenido mediante HPLC (0,2 µg/g), RIA (0,15 µg/g) o ELISA (0,1-0,2 µg/g). No obstante, el tiempo dedicado a la preparación de las muestras fue inferior en comparación al resto de las metodologías.

#### 1.3.3.1.5. Cromatografía en el estado supercrítico acoplada a la espectrometría de masas (SFC-MS)

La utilización del acoplamiento de la extracción de fluidos en el estado supercrítico con la cromatografía de gases en la cuantificación de la androstenona y del escatol permite reducir significativamente el tiempo de análisis. Los sistemas de detección utilizados son diversos: detectores NPD, previa derivatización de la androstenona con hidrocloreuro de metoxiamina en piridina (Zabolotsky y col., 1995) y espectrometría de masas (Mågård y col., 1995).

El desarrollo en los últimos años de la cromatografía de líquidos en el estado supercrítico (SFC) presenta numerosas ventajas en la separación de determinadas biomoléculas, como los esteroides. Tuomola y col. (1998) aplicaron esta metodología analítica acoplada a la espectrometría de masas con ionización química a presión atmosférica (SFC-APCI-MS) en la determinación de androstenona en grasa dorsal de cerdo. La principal ventaja del procedimiento desarrollado por estos autores es que permitió el análisis directo de las muestras de grasa sin necesidad de realizar purificaciones previas de los extractos. Además, la preparación de las muestras es simple, ya que sólo requiere fundir la grasa en un microondas a la temperatura adecuada y su disolución posterior en las condiciones apropiadas para el análisis cromatográfico.

#### 1.3.3.1.6. La nariz electrónica con red neuronal

En los últimos años la aparición de distintos tipos de sensores comerciales (biosensores, de gases, químicos, de masa, electroquímicos, conductimétricos) capaces de presentar respuestas diferenciadas y rápidas frente a grupos de compuestos de características determinadas ofrece una alternativa, junto a las metodologías de Head Space, para evaluar y caracterizar el aroma global de los productos cárnicos.

Los sensores de gas se desarrollaron, inicialmente, para detectar la presencia de gases inflamables, aunque posteriormente Aishima (1991) mostró que también son capaces de reconocer compuestos volátiles (aldehidos, cetonas, alcoholes, aminas) obtenidos a partir de técnicas de *Head Space*. En la actualidad, existen diversos tipos de sensores de gas que se distinguen, básicamente, en dos grandes grupos en función de la temperatura a la que trabajan.

Los sensores fríos están constituidos por materiales orgánicos que requieren temperaturas de trabajo inferiores a 100°C. La principal ventaja de estos sensores es la amplia variedad de materiales orgánicos con diferentes grupos funcionales que utilizan como material sensible y, por tanto, su capacidad de interactuar con moléculas que presenten notaciones sensoriales muy diversas. Dentro de los sensores fríos encontramos a los sensores poliméricos, formados por polímeros orgánicos semiconductores (politiofeno, polianilinas, polipirrol) químicamente modificados, que transmiten la corriente eléctrica gracias a la alternancia de dobles enlaces que presenta su estructura. La interacción de los compuestos volátiles con la superficie del sensor modifica la conductividad del polímero que se mide eléctricamente.

Los sensores piezoeléctricos son sensores químicos que trabajan a temperaturas bajas y el material sensible se adsorbe sobre la superficie de un sustrato piezoeléctrico. Estos sensores presentan una gran variedad y selectividad, ya que utilizan fases cromatográficas como adsorbentes. Los dos tipos principales de sensores pertenecientes a este grupo son las microbalanzas de cuarzo (MBC) y los sensores de ondas acústicas de superficie (SAW).

Los sensores calientes operan a temperaturas superiores a los 100°C y utilizan óxidos de metales semiconductores ( $\text{SnO}_2$ ,  $\text{ZnO}$ ,  $\text{CuO}$ ) como material sensible. La sensibilidad y selectividad de estos sensores depende, básicamente, de la temperatura y de las características del metal. Dentro de este tipo de sensores podemos distinguir dos grandes grupos: los sensores de óxidos de metales semiconductores (MOS) y los sensores de óxidos de metales semiconductores integrados en un circuito transistor (MOSFET).

En general, los sensores calientes son más robustos y menos sensibles a la humedad y presentan una sensibilidad de 0,1-100 ppm (Gardner y Bartlett, 1994). Los sensores de polímeros orgánicos conductores y los SAW son

más adecuados para determinar volátiles a niveles inferiores de ppb (Haugen y Kvaal, 1998).

Una nariz electrónica es un instrumento que comprende una matriz de sensores químicos que presentan una especificidad parcial frente a determinadas familias de compuestos y un sistema de clasificación numérico capaz de reconocer olores simples o complejos (Gardner y Bartlett, 1994). Los sensores de gas más frecuentes en los instrumentos comerciales son los sensores de óxidos de metales semiconductores y de polímeros orgánicos conductores, aunque recientemente en algunos instrumentos comerciales también se pueden incorporar sensores SAW y MBC. En la actualidad, algunos instrumentos adaptados a aplicaciones concretas combinan sensores de distintas tecnologías (MOS, MOSFET, MBC), pero su eficacia no está comprobada dado que sus características de funcionamiento (flujo, temperatura) son diferentes.

Por el momento, los principales problemas o puntos críticos que presenta la utilización de sensores de gas están relacionados con su baja sensibilidad, reproducibilidad y duración (Haugen y Kvaal, 1998). En principio, la sensibilidad analítica puede mejorarse al aumentar la cantidad relativa de muestra en la fase vapor o al ajustar las condiciones del equilibrio y el tiempo de toma de muestra de los sensores. La calibración del sistema con muestras referencia o control es imprescindible para que los resultados sean comparables en el tiempo y para asegurar una correcta clasificación de muestras reales. Por último, el reemplazamiento de los sensores cada cierto tiempo de funcionamiento supone un coste económico adicional y la necesidad de recalibrar el instrumento de nuevo. Además, el sistema desarrollado hasta el momento determina básicamente el perfil aromático de un producto y es importante considerar la posible influencia de la matriz en la respuesta de los sensores (Van Dijk, 1995).

La aplicación de la nariz electrónica en la industria cárnica en el control de calidad de los alimentos, la caracterización de los productos y la detección del olor sexual ha despertado un notable interés por las diversas ventajas que presenta frente a otras metodologías de evaluación del aroma, tales como una velocidad de respuesta rápida, la capacidad de automatización y de determinaciones *on-line*, versatilidad, un manejo de los resultados fácil y rápido y, una vez entrenada, una gran accesibilidad para ser utilizada por personal no especializado. No obstante, esta técnica no puede substituir

completamente los paneles sensoriales porque requiere calibraciones frecuentes frente a métodos de referencia.

Berdagué y Talou (1993) evaluaron la aplicación de la nariz electrónica en la clasificación de productos cárnicos y materias primas. Según los resultados obtenidos, la aplicación de esta técnica permitió detectar diferencias entre salchichones elaborados con carne procedente de cerdos enteros o de hembras. Estudios preliminares han mostrado que un 80%, aproximadamente, de las muestras que presentaban concentraciones elevadas de androstenona se clasificaron correctamente mediante un sistema experimental de sensores de gas (Berdagué y col., 1995). Bourrounet y col. (1995) evaluaron la aplicabilidad de cinco sensores de gas en la clasificación de muestras de grasa de cerdo con distintos niveles de concentración de androstenona ( $<0,7 \mu\text{g/g}$  y  $>1,7 \mu\text{g/g}$ , respectivamente) y, de acuerdo con el tratamiento estadístico de los resultados, un 84% de las muestras fueron clasificadas correctamente en su respectivo grupo de concentración, tal y como se comprobó mediante ELISA.

Annor-Frempong y col. (1997a, 1998), mediante una nariz electrónica formada por doce sensores poliméricos y un tratamiento de los resultados con análisis discriminante, clasificaron correctamente un 90%, aproximadamente, de las muestras de grasa dorsal de cerdo con distintas concentraciones de escatol y androstenona (BB, AB, BA y AA).

#### 1.3.3.2. Métodos cromatográficos

La mayoría de los métodos cromatográficos desarrollados para determinar los compuestos relacionados con el olor sexual en muestras de tejido adiposo requieren laboriosos procedimientos de extracción y/o purificación. La cromatografía en fase sólida se utiliza para eliminar del extracto los triglicéridos y ácidos grasos, que dificultan el análisis cromatográfico. La baja sensibilidad de algunos de los sistemas de detección utilizados requiere la derivatización previa de las sustancias a analizar. Sin embargo, estos procedimientos, aunque son muy específicos, no son lo suficientemente simples ni rápidos para su aplicación en la línea de sacrificio. Algunos métodos desarrollados permiten determinar la concentración de androstenona y escatol en otros tejidos (suero, plasma, glándulas salivares) que requieren procesos de extracción y purificación de menor complejidad. La sensibilidad, linealidad y recuperación de los métodos cromatográficos descritos en la bibliografía para la determinación de indol, escatol y

androstenoa en diferentes tejidos se presentan en la Tabla 1.2 y en la Tabla 1.3 .

El análisis de indol y escatol se ha descrito mediante cromatografía de gases (Bradley y Carlson, 1974) y cromatografía líquida (Claus y col., 1993) en muestras de plasma. Tuomola y col. (1996b, c) evaluaron la posibilidad de determinar la concentración de escatol e indol en suero y glándulas salivares de cerdos enteros. La concentración media de escatol en las glándulas salivares de los animales es inferior a la de la grasa y, generalmente, inferior al límite de detección de los métodos analíticos desarrollados. Los resultados obtenidos por Tuomola y col. (1996b, c) indicaron que las concentraciones de escatol e indol en las glándulas salivares y en el suero se correlacionan significativamente con los niveles observados en el tejido adiposo.

#### 1.3.3.2.1. Cromatografía de gases

En la bibliografía se han descrito numerosos procedimientos analíticos para determinar la concentración de escatol, indol, androstenoa y androstenoles, principalmente en muestras de grasa dorsal, mediante la cromatografía de gases acoplada a diversos detectores: ionización de llama (GC-FID), captura de electrones (GC-ECD), nitrógeno-fósforo (GC-NPD) o a un espectrómetro de masas (GC-MS).

Los pasos críticos en el desarrollo de estos métodos cromatográficos son los procedimientos de extracción y purificación de las muestras debido a la naturaleza lipofílica de los compuestos relacionados con el olor sexual.

##### 1.3.3.2.1.1. Análisis de indol y escatol

Vold (1970) asoció la presencia de escatol en el tejido adiposo porcino con el desarrollo del olor sexual. Hanson y col. (1980) y Whittington y col. (1995) describieron un procedimiento de destilación para la extracción del escatol. Las muestras de grasa se mantuvieron en ebullición bajo reflujo durante dos horas y en presencia de agua destilada. Los compuestos volátiles se recogieron en una mezcla de pentano:éter (9:1).



Tabla 1.2. Métodos cromatográficos para la determinación de indol y escatol citados en la bibliografía

<i>Cita</i>	<i>Método</i>	<i>Tejido</i>	<i>Sensibilidad</i>	<i>Linealidad</i>	<i>Recuperación escatol (%)</i>	<i>Recuperación indol (%)</i>
Bradley y Carlson (1974)	GC-FID	Plasma	0,01 µg/ml		97,2	91,3
Norheim y Rygge (1978)	GC-NPD	Plasma	0,005 µg/ml		96,7	79,7
Peleran y Bories (1985)	GC-NPD	Grasa	0,025 µg/g	0-10 ng	100,7	79,8
García-Regueiro y col. (1986 a)	HPLC-FR	Grasa	0,05 µg/g	0,05-1 µg/g	95,4	86,9
García-Regueiro y Díaz (1989)	HPLC-FN	Grasa	0,01 µg/g		90,1	90,4
Porter y col. (1989)	GC-FID	Grasa	0,02 µg/g	0,05-5 µg/ml *	92,1	87,9
Wilkins (1990)	HPLC-FR	Intestino	0,3 µg/g		94,8	98,1
Lin y col. (1991)	HPLC-FR	Suero	0,1 ng/µl		51,9	
Dehnhard y col. (1991)	HPLC-FR	Heces	0,2 µg/g	0,5-10 µg/g	95,4	
Hansen-Møller (1992)	HPLC-FR	Grasa	0,015 µg/g	0,002-1,5 µg/g	92,7	117,4
Dehnhard y col. (1993)	HPLC-FR	Grasa	4 ng/g	10-750 ng/g	98,5	93,8
Claus y col. (1993)	HPLC-FR	Plasma	0,15 ng/ml	0,125-2 ng/ml	113,6	95,4
Jensen y Jensen (1994)	GC-NPD	Heces	0,02 µg/g	0-100 mg/kg	102,4	110,1
Hansen-Møller (1994)	HPLC-FR	Grasa	30 ng/g		96,9	104,8
Tuomola y col. (1996b, c)	HPLC-FR	Grasa	1 ng/g	1-1000 ng/g	99,3	99,7
		Suero	0,1 ng/ml	0,1-100 ng/ml *	98,2	94,3

\* Linealidad determinada en soluciones patrón

Tabla 1.3. Métodos analíticos para la determinación de androstenona citados en la bibliografía

<i>Cita</i>	<i>Método</i>	<i>Tejido</i>	<i>Sensibilidad</i>	<i>Linealidad</i>	<i>Recuperación (%)</i>	<i>C.V.(%)</i>
Kaufmann y col. (1976)	GLC-FID	Grasa	0,06 µg/g	0,3-4,5 µg/g	102,6	1,3-7,6 (n=5)
Thompson y Pearson (1977)	GC-MS	Grasa	50 ng/g	0,02-0,20 mg/ml	72,4	4,9 (n=27)
DeBrabander y Verbeke (1986)	GC-ECD	Grasa	0,04 µg/g	0,08-6 µg/g	100,2	
Claus y col. (1988)	ELISA	Grasa	0,04 µg/g	0-2 µg/g	110,8	11,5-13,9 (n=8)
Shilt y col. (1989)	GC-MS	Grasa	0,05 µg/g	0,05-1 µg/g	79,4-96,7	8-16 (n=8)
García-Regueiro y Díaz (1989)	GC-MS	Grasa	0,025 µg/g	0-10 ng	75,4	
Abouzied y col. (1990)	ELISA	Suero	0,05 ng/ml	20-210 ng/ml	85,6	9,9 (n=10)
Hansen-Møller (1994)	HPLC-FR	Grasa	200 ng/g	0,1-0,6 µg/g	100,7	2,2-11,1 (n=7)
Mågård y col. (1995)	SFE/GC-MS	Grasa	0,05 µg/g	0,1-5 µg/g	89,6	6,6 (n=6)
Tuomola y col. (1996a)	Fluoroinmunoensayo	Grasa	40 ng/g	50-4000 ng/g	98,7	6,4 (n=10)
		Suero	0,8 ng/ml	1-90 ng/ml	103,8	8,1 (n=10)
Claus y col. (1997a)	ELISA	Grasa	0,04 µg/g	0-2 µg/g	110,8	8-16 (n=5)
Tuomola y col. (1998)	SFC-APCI-MS	Grasa	0,25 µg/g	0,25-25 µg/g	96,7	3,5-5,7 (n=5)

La extracción de los compuestos indólicos mediante la utilización de disolventes orgánicos se ha evaluado en diversos tejidos. Bradley y Carlson (1974) utilizaron diclorometano y Norheim y Rygge (1978) benceno para extraer el escatol del plasma. Peleran y Bories (1985) extrajeron selectivamente el indol y el escatol de muestras de tejido adiposo mediante n-trideciloheptano. Lin y col. (1991) adaptaron el procedimiento de extracción desarrollado por Peleran y Bories (1985) para extraer el escatol del suero. Por último, Jensen y Jensen (1994) extrajeron el escatol e indol de las heces en cloroformo.

La purificación de los extractos grasos se realiza generalmente mediante cromatografía en fase sólida. La retención de los compuestos permite su concentración dentro de la columna y una posterior elución selectiva. El escatol e indol pueden purificarse mediante cromatografía en fase sólida en condiciones polares o apolares. La aplicación de diferentes técnicas cromatográficas permite simplificar la purificación de estos compuestos mediante el uso de minicolumnas preparadas en el laboratorio o fabricadas comercialmente.

La precipitación en metanol a temperaturas bajas elimina parte del material lipídico y facilita la purificación posterior de los extractos, aunque es necesario optimizar el tiempo de congelación para evitar la coprecipitación de los compuestos evaluados. Porter y col. (1989) homogeneizaron las muestras de grasa en metanol y, posteriormente, dispusieron los extractos a  $-40^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos. La purificación se realizó en columnas de 0,5 gramos de sílica modificada (Bond-Elut 20H Diol) y los compuestos indólicos se eluyeron en una mezcla de éter dietílico:acetona (1:1).

La utilización de columnas de relleno para la separación cromatográfica del indol y del escatol (Norheim y Rygge, 1978; Peleran y Bories, 1985; Lin y col., 1991) ofrece una mayor capacidad de muestra, pero su eficacia es inferior a la observada en columnas capilares (Porter y col., 1989; Jensen y Jensen, 1994; Whittington y col., 1995). La mayoría de autores utilizan el helio como gas portador, porque ofrece una seguridad superior a la del hidrógeno (Porter y col., 1989). La inyección en modo *splitless* aumenta la sensibilidad relativa del método al introducir una mayor cantidad de muestra en la columna (Porter y col., 1989).

La utilización de los detectores de ionización de llama requiere el uso de cantidades de muestra elevadas (10 gramos) y la realización de purificaciones exhaustivas para eliminar las interferencias de los extractos

(Porter y col., 1989), ya que la falta de especificidad de este detector favorece la presencia de compuestos que interfieren en la identificación y cuantificación del escatol (Bradley y Carlson, 1974). Los detectores de moléculas con átomos de nitrógeno (NPD) aumentan la selectividad y sensibilidad (entre 50-100 veces, dependiendo del número de átomos de nitrógeno de la molécula) del análisis cromatográfico y, en consecuencia, facilitan una simplificación de los procedimientos de purificación (Verga y Poy, 1976). Además, la obtención de cromatogramas con una menor complejidad asegura una identificación precisa de los picos eluidos (Norheim y Rygge, 1978; Peleran y Bories, 1985; Jensen y Jensen, 1994; Whittington y col., 1995).

La cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas (GC-MS) permite una identificación adecuada de los compuestos separados y un incremento notable de la sensibilidad y selectividad del análisis. Además, la espectrometría de masas en modo SIM (*Selected Ion Monitoring*) genera cromatogramas selectivos mediante la selección de los fragmentos  $m/z$  característicos de los distintos compuestos estudiados (Peleran y Bories, 1985).

Las condiciones cromatográficas de los métodos analíticos citados en la bibliografía para la determinación de indol y escatol por cromatografía de gases se presentan en la Tabla 1.4.

#### 1.3.3.2.1.2. Determinación de androstenona y androstenoles

Para la determinación de la androstenona, Patterson (1968a) y Beeri y col. (1971) fundieron la grasa a 55°C y los compuestos volátiles extraídos mediante destilación a 90°C se retuvieron en una trampa de nitrógeno líquido y, posteriormente, se recuperaron en éter dietílico. No obstante, Kaufmann y col. (1976) señalaron que la volatilidad de la androstenona disminuye al aumentar la cantidad de grasa utilizada. Sjövall y Axelson (1979) utilizaron una mezcla de cloroformo y metanol para extraer la androstenona de muestras de saliva y orina. García-Regueiro y col. (1986b) y Hansen-Møller (1994) describieron la utilización de metanol para la extracción de la androstenona y García-Regueiro y Díaz (1989) para la extracción de los androstenoles de muestras de grasa dorsal. Schilt y col. (1989) extrajeron la androstenona en acetato de etilo a 50°C durante 30 minutos. El extracto obtenido se centrifugó y el disolvente se evaporó bajo un flujo de nitrógeno.

Tabla 1.4. Separación por cromatografía de gases y sistemas de detección utilizados en los métodos citados en la bibliografía para la determinación de indol y escatol

<i>Cita</i>	<i>Columna</i>	<i>Programa temperatura</i>	<i>Gas portador</i>	<i>Inyección</i>	<i>Detector</i>
Bradley y Carlson (1974)	21% Carbomax 4000 (183 x 0,32 cm)	Isoterma (180°C)	He (25 ml/min)	<i>Splitless</i>	FID
Norheim y Rygge (1978)	3% OV-17 (2 m x 4 mm)	Isoterma (145°C)	He (44 ml/min)	<i>Split</i>	FID
Peleran y Bories (1985)	3% SP 2250 (1,5 m x 2 mm)	110°C (2min)-5°C/min-220°C	N <sub>2</sub> (30 ml/min)	<i>Split</i>	NPD
	FSOT OV-1 (12,5 m x 0,2 mm)	95°C (1min)-5°C/min-140°C	He (0,8 ml/min)		MS (SM)
Porter y col. (1989)	FSOT BP-20 (25 m x 0,32 mm, 0,5µm)	50°C (2min)-20°C/min-185°C (5min)- 20°C/min-240°C (16 min)	H <sub>2</sub> (40 cm/s)	<i>Splitless</i>	FID
Lin y col. (1991)	3% OV-17 (1,5 m x 2 mm)	140°C (2min)-1°C/min-145°C (2min)	N <sub>2</sub> (30 ml/min)	<i>Splitless</i>	NPD
Jensen y Jensen (1994)	FSOT BP-20 (25 m x 0,2 mm, 0,5µm)	120°C-20°C/min-250°C (5min)	He (2,5 ml/min)	<i>Splitless</i>	NPD
Whittington y col. (1995)	FSOT WCOT CPWAX 57CB (25 m x 0,32 mm)		He		NPD

La saponificación de los extractos grasos es uno de los procedimientos más utilizados en la extracción de los esteroides relacionados con el olor sexual. Las condiciones de extracción de la androstenona descritas son diversas. Claus y col. (1971) y García-Regueiro y Díaz (1985) homogeneizaron la grasa con NaOH 0,1N en metanol y el material insaponificable se extrajo en una mezcla de diclorometano:acetato de etilo (1:1). Beerli y col. (1971) fundieron la grasa a 70°C y la saponificaron con una solución alcohólica de KOH. Posteriormente, la androstenona se extrajo en éter dietílico. Kaufmann y col. (1976) añadieron una solución de KOH/MeOH al 10%, benceno y agua sobre la muestra de grasa y recogieron la fracción insaponificable en hexano. Thompson y Pearson (1977) saponificaron la grasa con KOH/etanol y extrajeron el material insaponificable en hexano. DeBrabander y Verbeke (1986) y DeBrabander y col. (1986) saponificaron la grasa con KOH/MeOH al 10% a una temperatura de 80°C durante una hora y la fracción insaponificable se recuperó en una mezcla de metanol, agua destilada, tolueno y petróleo.

La purificación del material saponificado mediante técnicas de partición líquido-líquido elimina la mayoría de compuestos interferentes presentes en la grasa inicial. No obstante, la extracción mediante disolventes orgánicos del material insaponificable es un proceso delicado, debido a la formación de interfases de tipo jabonoso y abundante espuma, que dificulta la separación entre las dos fases. De este modo, la realización de numerosos lavados incrementa la cantidad de disolvente utilizado, el tiempo de análisis y las pérdidas de androstenona. Kaufmann y col. (1976) observaron que la utilización de una mezcla de metanol:agua (70:30) y hexano para la extracción de los compuestos de mayor polaridad del material saponificado disminuye la formación de emulsiones. La utilización de la cromatografía de gases simplifica el desarrollo del método, porque incrementa la sensibilidad de la detección y permite, por tanto, una reducción de la cantidad de muestra inicial. Así, se favorece la separación entre la fase acuosa y la fase orgánica, se reduce el consumo de disolventes y se facilita la aplicación de métodos de purificación sencillos y rápidos.

García-Regueiro y Díaz (1985) compararon la extracción de la androstenona de muestras de grasa mediante la utilización de disolventes orgánicos (acetato de etilo) o mediante la saponificación con NaOH 0,1N. Los porcentajes de recuperación de la 5 $\alpha$ -An fueron similares entre ambas

metodologías de extracción, pero ligeramente inferiores cuando se saponificó la grasa. Además, esta metodología requiere un tiempo de análisis superior y genera artefactos que dificultan la determinación del compuesto de interés o favorece su modificación química.

La sílica gel, en diferentes modos de elución, es el adsorbente más utilizado en la purificación de los extractos grasos. Claus y col. (1971) usaron columnas de vidrio con un diámetro interno de 1 cm para aislar la androstenona del material lipídico. Los compuestos interferentes presentes en las fracciones eluidas se purificaron mediante cromatografía en capa fina. Sjövall y Axelson (1979) separaron los esteroides mediante cromatografía de filtración de gel y Schilt y col. (1989) utilizaron esta técnica cromatográfica para separar la androstenona de las interferencias lipídicas. La columna utilizada presentó un límite de exclusión de 2000 Dalton y una capacidad de carga de 100 mg de extracto graso.

García-Regueiro y Díaz (1985) utilizaron columnas de vidrio de 20 cm x 1 cm empaquetadas con capas sucesivas de sulfato sódico anhidro, sílica gel y sulfato sódico anhidro. La androstenona se eluyó en una mezcla de ciclohexano:acetato de etilo (98:2). García-Regueiro y col. (1986b) y García-Regueiro y Díaz (1989) eliminaron parte del material lipídico por precipitación en metanol a temperaturas de congelación. Posteriormente, utilizaron columnas de florisil para separar la androstenona (García-Regueiro y col., 1986b) o la androstenona y los androstenoles (García-Regueiro y Díaz, 1989). La 5 $\alpha$ -An se eluyó en hexano:éter (40:60) y la androstenona-androstenoles en diclorometano seguido de una mezcla de diclorometano:metanol (2:1).

La cromatografía en capa fina (TLC) se utiliza como sustituto o complemento de la cromatografía en columna. En general, esta metodología implica una manipulación difícil de las muestras, tiempos de análisis elevados y una disminución del rendimiento analítico. Bicknell y Gower (1971) aplicaron la cromatografía en capa fina bidimensional para separar 16 esteroides, entre los que se hallaban algunos androstenos. Claus y col. (1971) utilizaron esta técnica para repurificar las fracciones obtenidas en la cromatografía en fase sólida. Kaufmann y col. (1976) consideraron que la purificación de los extractos obtenidos mediante TLC presenta mejores resultados que la cromatografía en columna. Beerl y col. (1971) y Thompson y Pearson (1977) utilizaron la TLC preparativa como único método de purificación de la androstenona. Las placas de sílica se

desarrollaron en una mezcla de benceno:acetato de etilo (95:5). Posteriormente, la  $5\alpha$ -An se extrajo de la sílica en cloroformo:metanol (2:1).

La separación por cromatografía de gases de la androstenona se ha descrito mediante la utilización de columnas capilares preparadas con fases estacionarias apolares (García-Regueiro y Díaz, 1985; DeBrabander y Verbeke, 1986), pero la determinación de los androstenoles en estas condiciones es crítica. Brennan y col. (1986) cuantificaron los androstenoles asociados al olor sexual ( $5\alpha$ -An- $3\alpha$ -ol y  $5\alpha$ -An- $3\beta$ -ol) como un único compuesto al no poder efectuar su separación completa. La utilización de columnas de polaridad intermedia (RLS-300) resulta más adecuada en el análisis de estos compuestos, porque ofrecen una mayor resolución, selectividad y presentan una estabilidad térmica aceptable. En la bibliografía sólo se describe un método analítico que permite la determinación simultánea de la androstenona y de los dos androstenoles ( $5\alpha$ -An- $3\alpha$ -ol y  $5\alpha$ -An- $3\beta$ -ol) mediante cromatografía de gases (García-Regueiro y Díaz, 1989).

La detección de la androstenona y de los androstenoles mediante detectores de ionización de llama es efectiva cuando los extractos finales no presentan excesivas impurezas ni interferencias que dificulten la identificación de los compuestos (García-Regueiro y Díaz, 1985, 1989; García-Regueiro y col., 1986b). No obstante, estos detectores no presentan una selectividad elevada y la cantidad de muestra aplicada debe incrementarse, debido a su baja sensibilidad. La utilización de los detectores de captura de electrones, previa derivatización de la androstenona con pentafluorobenzilhidroxilamina (PFBHA.HCl), aumenta la especificidad y sensibilidad de la detección y facilita la purificación de los extractos al disminuir la cantidad de muestra inicial (García-Regueiro y Díaz, 1985; DeBrabander y Verbeke, 1986; DeBrabander y col., 1986). El empleo del inyector PTV evita la degradación térmica de los derivados obtenidos (García-Regueiro y Díaz, 1985, 1989).

La GC-MS permite una identificación selectiva de las sustancias estudiadas (Patterson, 1968a, b; Thompson y Pearson, 1977; García-Regueiro y Díaz, 1989; Schilt y col., 1989) y la selección de fragmentos de masa/carga característicos de los distintos compuestos (modo SIM) aumenta la especificidad y sensibilidad del método.



Las condiciones cromatográficas de los métodos analíticos citados en la bibliografía para la determinación de androstenona por cromatografía de gases se presentan en la Tabla 1.5.

#### 1.3.3.2.2. Cromatografía líquida de alta resolución

##### 1.3.3.2.2.1. Determinación de escatol e indol

La determinación de los compuestos indólicos en muestras de grasa mediante HPLC acoplada a detectores de fluorescencia o ultravioleta presenta una mayor especificidad que los métodos de cromatografía de gases. No obstante, la preparación de las muestras también es laboriosa y requiere procesos de purificación previos al análisis cromatográfico.

La extracción del escatol e indol para su posterior análisis mediante cromatografía líquida se describe en numerosos trabajos. García-Regueiro y col. (1986a, b), García-Regueiro y Díaz (1989) y Tuomola y col. (1996b, c) utilizaron metanol para extraer los compuestos indólicos de muestras de grasa. García-Regueiro y col. (1986a, b) mantuvieron previamente los extractos a 50°C durante 5 minutos. Hansen-Møller (1992, 1994) homogeneizaron la grasa en una solución tampón 0,15M Tris (pH 7,6) - acetona (75:25, v/v) para extraer los compuestos indólicos y, seguidamente, sonicaron los extractos durante 5 minutos.

Dehnhard y col. (1993) fundieron la grasa en un microondas durante 4 minutos y disolvieron una alícuota en hexano. Los compuestos indólicos se analizaron directamente previa extracción en una mezcla de acetonitrilo:agua (75:25). El procedimiento de extracción desarrollado por estos autores es simple, el volumen de disolvente utilizado es mínimo y la ausencia de evaporaciones previas al análisis cromatográfico mejora la recuperación de las sustancias de mayor volatilidad. Los principales inconvenientes que presenta el método son las posibles degradaciones producidas por la temperatura y el tiempo consumido en obtener la fusión de la grasa.

Tabla 1.5. Separación por cromatografía de gases y sistemas de detección utilizados en los métodos citados en la bibliografía para la determinación de androstenona

<i>Cita</i>	<i>Columna</i>	<i>Programa temperatura</i>	<i>Gas portador</i>	<i>Inyección</i>	<i>Detector</i>
Kaufmann y col. (1976)	3% QF1 400 x 0,3 cm	Isoterma (205°C)	Ar (4 atm)		FID
Thompson y Pearson (1977)	5% SP-2401 (183 x 0,2 cm)	Isoterma (185°C)	He (22 ml/min)		MS (SIM)
García-Regueiro y Díaz (1985)	FSOT BP-1 (25 m x 0,3 mm; 0,25 µm)	80°C-4°C/min-260°C	He (35 cm/s)	<i>Splitless</i> <i>PTV</i>	FID
	FSOT OV-101 (25 m x 0,3 mm; 0,25 µm)	180°C-4°C/min-280°C			ECD
DeBrabander y Verbeke (1986)	FSOT CP SIL 5 (50 m x 0,23 mm)	Isoterma (270°C)	H <sub>2</sub> (1 ml/min)	<i>Split</i>	ECD
García-Regueiro y Díaz (1989)	FSOT RSL-300 (25 m x 0,25 mm, 0,25 µm)	80°C/min-4°C/min-280°C	He (30 cm/s)	<i>Splitless</i>	MS (SIM)
Schilt y col. (1989)	FSOT CP SIL 5 (25 m x 0,25 mm, 0,12 µm)	80°C (4min)-15°C/min-280°C (10min)- 30°C/min-300°C	He (30 cm/s)	<i>Splitless</i>	MS (SIM)
Mågård y col. (1995)	FSOT DB-1 (30 m x 0,32 mm, 0,25 µm)	100°C (1min)-20°C/min-300°C (10min)	He (2 ml/min)	<i>Splitless</i>	MS (SIM)

La extracción del indol y escatol en otros tejidos también se describe en la bibliografía. La extracción de los compuestos indólicos de muestras de suero se realizó mediante éter dietílico (Tuomola y col., 1996b, c) o selectivamente en n-tridecilociclohexano (Lin y col., 1991). Claus y col. (1993) también utilizaron éter dietílico para extraer el escatol de muestras de plasma. El metanol se utilizó también como solución de extracción para determinar el escatol e indol en glándulas salivares (Tuomola y col., 1996b, c), en heces (Dehnhard y col., 1991; Claus y col., 1993) y en el tracto digestivo (Wilkins, 1990).

La congelación de los extractos metanólicos favorece la precipitación de la grasa y facilita la posterior purificación de los extractos mediante cromatografía en fase sólida (García-Regueiro y col., 1986a, b; García-Regueiro y Díaz, 1989; Hansen-Møller, 1992, 1994; Tuomola y col., 1996b, c).

García-Regueiro y col. (1986a, b) y García-Regueiro y Díaz (1989) purificaron los extractos mediante columnas de vidrio empaquetadas con florisil y eluyeron el escatol y el indol en hexano:éter dietílico (80:20). Hansen-Møller (1992) y Tuomola y col. (1996b, c) utilizaron columnas de octadecilsilica (Bond-Elut C<sub>18</sub>, 500 mg) como fase estacionaria para retener los compuestos lipídicos en la columna, mientras que el indol y el escatol se eluían sin ser retenidos. Estos autores indicaron la necesidad de acondicionar la columna en acetona fría antes de aplicar la muestra para evitar una redisolución de la grasa. Dehnhard y col. (1991) y Claus y col. (1993) purificaron extractos de heces en columnas de Amberlite XAD-8 y eluyeron los compuestos indólicos en acetonitrilo al 100%.

En general, los diferentes trabajos citados en la bibliografía describen la separación cromatográfica de los compuestos indólicos mediante cromatografía líquida en fase reversa y en isocrático (García-Regueiro y col., 1986a, b; Lin y col., 1991; Hansen-Møller, 1993; Dehnhard y col., 1991, 1993; Tuomola y col., 1996b, c). No obstante, la cromatografía líquida en fase normal permite obtener una separación efectiva entre los compuestos indólicos estudiados y las interferencias de la matriz lipídica (García-Regueiro y Díaz, 1989).

Hansen-Møller (1992, 1993) desarrolló un método analítico que permite la determinación de escatol, indol y otros compuestos derivados del triptófano mediante cromatografía líquida en fase reversa y en gradiente. Los compuestos determinados fueron: triptófano, ácido indolacético, ácido 2

indolcarboxílico, ácido 3-indolcarboxílico, triptamina, ácido 3-indolpropiónico, 3-indolmetanol, ácido 3-indolbutírico, 3-indoletanol, 3-indolilacetónitrilo, indol, escatol y 2-metilindol.

La detección de los compuestos indólicos puede realizarse mediante detectores ultravioleta a una longitud de onda de 220 nm o 280 nm (García-Regueiro y col., 1986a, b; García-Regueiro y Díaz, 1989; Wilkins, 1990; Dehnhard y col., 1991; Lin y col., 1991) o mediante detectores fluorimétricos (Hansen-Møller, 1992, 1994; Dehnhard y col., 1993; Claus y col., 1993; Tuomola y col., 1996b, c), que ofrecen una mayor selectividad y sensibilidad.

Las condiciones cromatográficas de los métodos analíticos citados en la bibliografía para la determinación de indol y escatol mediante cromatografía líquida de alta resolución se presentan en la Tabla 1.6.

#### 1.3.3.2.2. Determinación de la androstenona

García-Regueiro y col. (1986b) describieron un método analítico que permite la determinación de la androstenona mediante HPLC. La extracción de la 5 $\alpha$ -An y la purificación de los extractos se realizó según se describe en el apartado 1.3.3.2.1.2. La derivatización de la 5 $\alpha$ -An con 2,4-dinitrofenilhidracina (2,4-DNPH) permitió su determinación mediante cromatografía líquida y detección ultravioleta a una longitud de onda de 360 nm (García-Regueiro y col., 1986b). La cuantificación de la androstenona mediante esta metodología presentó mayores dificultades en comparación a la cromatografía de gases y sólo se obtuvieron resultados precisos cuando se observaban concentraciones elevadas de androstenona.

Las condiciones cromatográficas de los métodos analíticos citados en la bibliografía para la determinación de androstenona mediante cromatografía líquida de alta resolución se presentan en la Tabla 1.7.

Tabla 1.6. Separación por cromatografía líquida y sistemas de detección utilizados en los métodos citados en la bibliografía para la determinación de indol y escatol

<i>Cita</i>	<i>Columna</i>	<i>Fase móvil</i>	<i>Detección</i>
García-Regueiro y col. (1986a)	Lichrosorb RP-18 10 µm (4,6 x 250 mm)	MeOH:H <sub>2</sub> O (60:40)	UV (280 nm)
García-Regueiro y Díaz (1989)	Spherisorb NH <sub>2</sub> 10 µm (4 x 250 mm)	Hexano:alcohol isopropílico (96:4)	UV (280 nm)
Wilkins (1990)	Nucleosil 5 C18 5µm (4 x 250 mm)	MeOH:0,006M H <sub>2</sub> NaPO <sub>4</sub> (55:45)	UV (280 nm)
Lin y col. (1991)	Lichrosorb RP-18 10 µm (4,6 x 250 mm)	MeOH:H <sub>2</sub> O (60:40)	UV (280 nm)
Dehnhard y col. (1991)	Lichrosorb RP-18 5 µm (4,6 x 125 mm)	0,02M CH <sub>3</sub> COOH:2-propanol:CH <sub>3</sub> CN (60:15:25)	UV (280 nm)
Hansen-Møller (1992)	Lichrospher RP-Select B 5 µm (4 x 250 mm)	A) CH <sub>3</sub> CN:50mM K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (pH 6,0) (5:95) B) CH <sub>3</sub> CN:H <sub>2</sub> O (90:10)	λ <sub>exc</sub> 285 nm λ <sub>em</sub> 340 nm
Dehnhard y col. (1993)	Chrospher RP-18 5 µm (4,6 x 65 mm)	CH <sub>3</sub> COOH:isopropanol (70:30)	λ <sub>exc</sub> 275 nm λ <sub>em</sub> 345 nm
Claus y col. (1993)	Lichrospher RP-Select B 5 µm (4,6 x 125 mm)	H <sub>2</sub> O:CH <sub>3</sub> CN:2-propanol (60:25:15)	λ <sub>exc</sub> 275 nm λ <sub>em</sub> 345 nm
Hansen-Møller (1994)	Hypersil ODS 3 µm (4,6 x 60 mm)	A) THF:25mM K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> :CH <sub>3</sub> COOH (31:67,6:1,4) B) THF:CH <sub>3</sub> CN:25mM K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> :CH <sub>3</sub> COOH (34:23,8:41;4:0,8) C) THF:H <sub>2</sub> O (90:10)	λ <sub>exc</sub> 285 nm λ <sub>em</sub> 340 nm
Tuomola y col. (1996b, c)	Superspher 100 RP-18 4 µm (4 x 125 mm)	H <sub>2</sub> O:CH <sub>3</sub> CN (60:40)	λ <sub>exc</sub> 270 nm λ <sub>em</sub> 350 nm

Tabla 1.7. Separación por cromatografía líquida y sistemas de detección utilizados en los métodos citados en la bibliografía para la determinación de androstenona

<i>Cita</i>	<i>Columna</i>	<i>Fase móvil</i>	<i>Detector</i>
García-Regueiro y col. (1986b)	Nucleosil RP-18 (5µm; 100 x 4 mm)	CH <sub>3</sub> CN:H <sub>2</sub> O (90:10)	UV (360 nm)
Hansen-Møller (1994)	Hypersil ODS (3 µm; 60 x 4,6 mm)	A) THF:25mM K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> :CH <sub>3</sub> COOH (31:67,6:1,4)	λ <sub>exc</sub> 285 nm
		B) THF:CH <sub>3</sub> CN:25mM K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> :CH <sub>3</sub> COOH (34:23,8:41,4:0,8)	λ <sub>em</sub> 340 nm
		C) THF:H <sub>2</sub> O (90:10)	

#### 1.3.3.2.2.3. Determinación de la androstenona y del escatol

El escatol y la androstenona son los compuestos considerados responsables del desarrollo del olor sexual y su determinación en la línea de sacrificio es imprescindible para la correcta clasificación de las canales. Los métodos que no permiten la determinación simultánea de escatol y androstenona no son adecuados para una correcta evaluación del olor sexual, dado la ausencia de correlación entre la concentración de ambos compuestos (Stern y col., 1992; Stamer y col., 1993).

Hansen-Møller (1994) desarrolló un método analítico que permite la determinación conjunta de escatol, indol y androstenona de forma rápida y sencilla, sin necesidad de purificar los extractos metanólicos obtenidos. La separación cromatográfica se realizó en una columna de octadecilsilica y fue necesario aplicar un gradiente ternario para su elución. La detección de los compuestos se realizó por fluorescencia. La androstenona se derivatizó a temperatura ambiente durante 5 minutos con dansilhidracina al 2% en metanol y en presencia de trifluoroborometanol al 20% como catalizador. Un aspecto importante del desarrollo de esta metodología fue el establecimiento de las condiciones adecuadas de derivatización de la androstenona sin que se produjera una modificación química de los compuestos indólicos. Las longitudes de onda de excitación y emisión se modificaron durante el análisis cromatográfico para detectar los derivados de la androstenona.

#### 1.3.3.3. Metodologías indirectas

Las metodologías indirectas no permiten determinar las concentraciones de los compuestos relacionados con el olor sexual, pero la información que ofrecen puede relacionarse indirectamente con la concentración de androstenona en el tejido adiposo porcino o con la presencia del olor sexual en las canales.

El tamaño y peso de los órganos sexuales (glándulas bulbouretrales) de los cerdos enteros se ha relacionado con el grado de madurez sexual y, por tanto, con el olor sexual (Bonneau y Desmoulin, 1981; Booth y col., 1986; Babol y col., 1996). Las características conformacionales de las glándulas salivares también se han correlacionado con la puntuación sensorial del olor sexual, aunque la determinación del tamaño de las glándulas bulbouretrales es más adaptable a la línea de sacrificio. Este procedimiento carece de precisión al no determinar directamente los niveles de los compuestos

relacionados con el olor sexual, pero puede ser aplicado como método de *screening* para realizar una primera clasificación de las canales y reducir el número de muestras a analizar mediante métodos analíticos más complejos. Babol y col. (1996) observaron que el tamaño de las glándulas bulbouretrales se correlaciona con el contenido de androstenona en grasa ( $r=0,60$ ) y con el grado de olor sexual ( $r=0,60$ ). Booth y col. (1986) obtuvieron unos valores similares al correlacionar el contenido de androstenona en grasa y glándulas salivares con el tamaño de las glándulas sexuales. Según citan Diestre y col. (1982), la correlación observada entre el tamaño de las glándulas sexuales y el nivel de androstenona en grasa fue de 0,6-0,8, mientras que la correlación entre el olor sexual y el tamaño de estas glándulas fue significativamente inferior (entre 0,28 y 0,34).

Las metodologías de *Head Space* dinámico permiten evaluar el perfil de los compuestos volátiles de muestras de grasa con olor sexual e identificar otros compuestos volátiles que pueden contribuir o potenciar el desarrollo del olor sexual. Viallon y col. (1992) y Berdagué y col. (1993b) describieron que algunos de los compuestos volátiles identificados en muestras de grasa mediante espectrometría de masas, como el orto-xileno y el decanal, se correlacionan significativamente con el contenido de androstenona.

#### 1.3.4. Porcentajes de distribución de la concentración de escatol y androstenona en las canales de cerdos enteros

La concentración de escatol y androstenona en el tejido adiposo de los cerdos enteros presenta una distribución amplia. Según un estudio realizado recientemente y en el que han participado siete países miembros de la UE, la proporción de cerdos con niveles de escatol inferiores a  $0,05 \mu\text{g/g}$  y en los intervalos de 0,05-0,10, 0,10-0,20, 0,20-0,50  $\mu\text{g/g}$  y superiores a  $0,50 \mu\text{g/g}$  fue de un 15, 42, 27, 12 y 4%, respectivamente (Bonneau, 1998; Walstra y col., 1999). Estudios realizados anteriormente (Bonneau y col., 1992a) mostraron que aproximadamente un 10% de los machos enteros sacrificados en Francia presentan una concentración de escatol superior al valor límite de aceptabilidad establecido ( $0,25 \mu\text{g/g}$ ). De acuerdo con estos resultados, Hennessy y col. (1995a) y Moss y col. (1997) señalaron que aproximadamente un 10% de los cerdos sacrificados entre 70-100 kilos presentan una concentración de escatol superior a  $0,20 \mu\text{g/g}$ . Berg y col. (1993), Andresen y col. (1993) y Von Seth y col. (1995) describieron unos resultados similares, aunque ligeramente superiores, debido a que un 15% y un 20% de los animales sacrificados en Suecia y



Noruega, respectivamente, presentaron concentraciones de escatol superiores a 0,20 µg/g.

No obstante, el porcentaje descrito en estudios realizados en otros países fue relativamente inferior. Weiler y col. (1997) observaron, en un estudio realizado en Alemania, que la frecuencia de canales con una concentración de escatol superior a 0,25 µg/g es de un 2,2%, mientras que Mortensen y col. (1986) y Lundström y col. (1988) obtuvieron unos porcentajes de un 5% y un 4%, respectivamente, en Suecia. En Dinamarca, un 53% de los animales sacrificados presentaron una concentración de escatol situada entre 0,06-0,10 µg/g y un 4,5% de los animales una concentración superior a 0,25 µg/g (Larson y col., 1993), resultados similares a los obtenidos en Francia por LeDenmat y col. (1993). Lundström y col. (1984) calcularon una concentración media de escatol en grasa de cerdo de 0,073 µg/g, similar a la obtenida por Hanson y col. (1980), mientras que Andresen y col. (1993) obtuvieron una concentración media de escatol de 0,25 µg/g. Sin embargo, ninguna de las hembras evaluadas presentó concentraciones elevadas de escatol.

La distribución de la concentración de androstenona observada en el estudio realizado en el ámbito de la UE fue: un 7, 24, 28, 22, 14 y 5% de los animales presentaron una concentración de androstenona de 0,20 µg/g, entre 0,20-0,50, 0,50-1,0, 1,0-2,0, 2,0-5,0 µg/g y superior a 5,0 µg/g, respectivamente (Bonneau, 1998; Walstra y col., 1999). Weiler y col. (1997) observaron en Alemania que entre un 39% y un 55% de las canales de cerdos enteros presentan una concentración de androstenona superior a 0,50 µg/g. Andresen y col. (1993) mostraron que un 58% de los animales sacrificados en Noruega presentan una concentración de androstenona inferior a 1,0 µg/g. Por otra parte, Stamer y col. (1993) describieron que un 87% de los cerdos sacrificados a un peso de 100 kilos presentan concentraciones de androstenona superiores a 0,50 µg/g, aunque un 28% de los cerdos de este grupo corresponde a animales con concentraciones superiores a 1,0 µg/g. LeDenmat y col. (1993) obtuvieron resultados ligeramente inferiores, ya que un 22% de los cerdos enteros sacrificados en Francia muestran concentraciones superiores a 0,50 µg/g. Sin embargo, los niveles de androstenona disminuyeron significativamente en todos los animales, situándose a niveles inferiores a 0,30 µg/g, cuando los cerdos se castraron. En Australia, donde los cerdos se sacrifican aproximadamente a un peso de 90 kilos, Hennessy y col. (1995a) describieron concentraciones de androstenona superiores a 0,50 µg/g en un 57,6% de los animales.

De acuerdo con resultados previos (Bonneau y col., 1992a), observaron que sólo un 1% de los cerdos sacrificados en Francia presentan concentraciones bajas de androstenona y altas de escatol, pero un 22% de los animales presentan concentraciones elevadas de androstenona y bajas de escatol (LeDenmat y col., 1993). Hennessy y col. (1995a) indicaron que aproximadamente entre un 10% y un 12% de los cerdos sacrificados en Australia presentan concentraciones elevadas de androstenona y escatol. Por otra parte, Annor-Frempong y col. (1997d) determinaron concentraciones elevadas de androstenona y escatol en un 5% de los cerdos estudiados, concentraciones elevadas de androstenona y bajas de escatol en un 35% de los animales y concentraciones bajas de ambos compuestos en los animales restantes. En este estudio, ninguno de los cerdos presentó niveles bajos de androstenona y altos de escatol.

#### 1.3.5. Límites de detección de los compuestos relacionados con el olor sexual.

##### Comparación entre métodos químicos y sensoriales

Los límites de detección de la androstenona (0,426  $\mu\text{g/g}$ ) y del escatol (0,026  $\mu\text{g/g}$ ) en soluciones patrón (Annor-Frempong y col., 1997b, c) difieren considerablemente de los márgenes de aceptabilidad establecidos en carne, especialmente los datos referidos al escatol (0,026  $\mu\text{g/g}$  en comparación a 0,20-1,0  $\mu\text{g/g}$ ). El origen de las diferencias descritas puede ser debido a que la determinación mediante métodos analíticos de las concentraciones de androstenona y escatol se efectúa en muestras de grasa dorsal sin cocinar, mientras que la evaluación sensorial se realiza en muestras de magro con un determinado contenido graso. Además, Agerhem y Tornberg (1995) y Nute y col. (1995) mostraron que la temperatura de presentación de las muestras para su evaluación sensorial ejerce una mayor influencia sobre la percepción del escatol en comparación a la androstenona.

Moss y col. (1993) indicaron que el límite de detección del indol en soluciones acuosas es de 250  $\mu\text{g/l}$ . Annor-Frempong y col. (1997c) observaron que los panelistas manifiestan respuestas diferentes frente a muestras control y muestras a las que se adicionaron 0,50  $\mu\text{g/g}$  de indol o una mezcla de indol y androstenona. No obstante, la diferenciación entre el indol y el escatol resulta difícil de establecer por sus características sensoriales similares.

García-Regueiro y Díaz (1989) determinaron sensorialmente los umbrales de detección del escatol y de la androstenona en muestras de grasa de hembras

fortificadas con cantidades conocidas de estos compuestos. El umbral de detección del escatol fue de 0,10 µg/g, similar al descrito por Moss y col. (1993) en un puré preparado a partir de músculo *Longissimus dorsi* y grasa en una proporción de 80:20 (0,08 µg/g).

El umbral de olfacción de la androstenona fue, de acuerdo con los estudios anteriores de Walstra y col. (1986), de 1,0 µg/g (García-Regueiro y Díaz, 1989). No obstante, Brooks y Pearson (1989) describieron un umbral inferior (0,6 µg/g) mediante tests triangulares y según la concentración mínima de androstenona detectada por el 75% de los panelistas. La determinación de los límites de detección de los androstenoles presentó mayor dificultad. García-Regueiro y Díaz (1989) indicaron unos valores similares a los descritos para la androstenona (1,0-1,50 µg/g), aunque el 5 $\alpha$ -An-3 $\alpha$ -ol mostró una mayor notación sensorial que su epímero. Brooks y Pearson (1989) establecieron unos umbrales de detección para el 5 $\alpha$ -An-3 $\alpha$ -ol y 5 $\alpha$ -An-3 $\beta$ -ol de 0,90 µg/g y 1,20 µg/g, respectivamente.

La calidad sensorial de la carne de cerdo depende, entre otros factores, de la concentración de androstenona y escatol de las canales de cerdos enteros y de la percepción de estos compuestos por parte de los consumidores. La determinación de las concentraciones de androstenona y escatol es imprescindible para evaluar si son suficientemente bajas para que las canales no presenten ningún problema y permitir la producción y comercialización de cerdos enteros, ya sea en su consumo como productos frescos o en su uso como materia prima en la elaboración de productos cárnicos.

Las concentraciones de los compuestos implicados que provocan el rechazo de las canales por presentar olor sexual son variables y se sitúan entre 0,20 µg/g y 0,25 µg/g para el escatol (Mortensen y col., 1986; Berg y col., 1993; Hansen-Møller y Godt, 1995) y entre 0,50 µg/g y 1,0 µg/g para la androstenona (Malmfors y Lundström, 1983; Bonneau y col., 1992a). Walstra y col. (1986) indicaron que el límite de aceptabilidad de la androstenona en grasa (0,75 µg/g) establecido en un estudio de consumidores realizado en Holanda era inadecuado, debido a que los consumidores no diferenciaron las muestras con concentraciones bajas de escatol y elevadas de androstenona de las muestras con concentraciones bajas de ambos compuestos. Sin embargo, la reducción del límite de aceptabilidad de la androstenona a 0,50 µg/g supondría un incremento notable de la proporción de canales descartadas para su consumo como carne fresca según la frecuencia de distribución de este país.

La aplicación de métodos de análisis químicos permite determinar el contenido de los compuestos relacionados con el olor sexual en los diferentes tejidos, pero los niveles de aceptabilidad deben ser establecidos mediante tests de especialistas y estudios de consumidores. Los panelistas puntúan la intensidad del defecto sensorial de las muestras evaluadas en una escala hedónica del 1 (extremadamente desagradable) al 10 (extremadamente agradable) y, además, caracterizan la presencia de olores anormales (*orina, sudor, heces, macho y naftalina*, entre otros) y valoran su intensidad. Estos estudios también permiten determinar la frecuencia o porcentaje de panelistas que asocian un olor desagradable a un descriptor determinado.

La respuesta de los consumidores frente a los compuestos responsables del olor sexual depende de las condiciones experimentales en las que se realiza el análisis sensorial, de la escala hedónica utilizada para la puntuación de la aceptabilidad y, principalmente, de la sensibilidad de los miembros del panel frente a los compuestos evaluados. Los atributos sensoriales de la carne de cerdo que se han relacionado con los compuestos implicados en el desarrollo del olor sexual son el olor a *orina* (Patterson, 1968a) o a *sudor* (Bonneau y col., 1992a) como descriptores discriminantes de la androstenona y el olor a *heces* (Hanson y col., 1980), a *naftalina* (Agerhem y Tornberg, 1995) o a *establo* (Dijksterhuis y col., 1997) para el escatol. Otros descriptores que se han relacionado con el desarrollo del olor sexual son: *amonio, amargo, sucio, picante, dulzón, moho y polilla*. Annor-Frempong y col. (1997b) señalaron la existencia de cierta sinergia entre la androstenona y el escatol que modifica la intensidad de sus notas sensoriales. La presencia simultánea de ambos compuestos en una solución patrón disminuye el olor a sudor, a moho o a polilla y aumenta el olor a amonio. A diferencia de los sistemas modelo, las notas sensoriales características de la androstenona y del escatol son difíciles de distinguir en muestras de grasa, observándose solamente diferencias significativas cuando ambos compuestos se presentan a concentraciones elevadas (Annor-Frempong y col., 1997d). Además, la presencia de otros compuestos en los tejidos de los animales influye en la percepción de los compuestos implicados en el olor sexual.

La clasificación de las canales de cerdos enteros en función de las concentraciones de escatol y androstenona determinadas mediante la aplicación de métodos químicos y de acuerdo a los límites de aceptabilidad establecidos para cada uno de los compuestos no coincide siempre con la evaluación sensorial de los miembros de un panel test, entrenados específicamente para la

detección del olor sexual. Mortensen y Sørensen (1984) describieron un coeficiente de correlación entre la evaluación sensorial de las canales y el método de análisis químico de 0,73. No obstante, Walstra y col. (1986) observaron que algunas canales con concentraciones de escatol y androstenona inferiores a los umbrales citados anteriormente (0,25 µg/g para el escatol y 0,50 µg/g para la androstenona) son clasificadas con olor sexual por los miembros de un panel test y Berg y col. (1993) indicaron que aproximadamente un 8% de las canales clasificadas con olor sexual presentan una concentración de escatol inferior a 0,20 µg/g.

Por otra parte, Hansen-Møller y Andersen (1994) observaron que un 1,2% de las canales aprobadas por los miembros de un panel test presentan concentraciones superiores a los límites de aceptabilidad establecidos (0,25 µg/g de equivalentes de escatol y 0,50 µg/g de androstenona). Bonneau y col. (1992a) también describieron discrepancias entre los resultados analíticos y sensoriales, concluyendo que ni el escatol ni la androstenona explican totalmente la variación observada en el olor sexual.

La sensibilidad define la capacidad de un método analítico de clasificar las canales con olor sexual cuando realmente se presenta este defecto sensorial. La especificidad se utiliza para determinar si las canales clasificadas químicamente sin olor sexual son aceptadas por los miembros de un panel test. Xue y col. (1996) mostraron que existe una probabilidad de un 4,5% de clasificar una canal con olor sexual cuando las concentraciones de escatol y androstenona son inferiores a 0,25 µg/g y 1,0 µg/g, respectivamente, y si la determinación de las concentraciones de estos compuestos se realiza mediante métodos colorimétricos no específicos (Mortensen y Sørensen, 1984; Squires, 1990). Por otra parte, la probabilidad de clasificar una canal sin olor sexual cuando las concentraciones de ambos compuestos sean superiores a los límites considerados es de un 74,1%. Los resultados descritos no son satisfactorios para la producción de cerdos enteros, ya que al menos dos de cada tres canales se clasificarían con olor sexual mediante los análisis químicos cuando en realidad no presentarían dicho defecto sensorial.

### 1.3.6. Consideraciones generales de los estudios de los panel-test y test de consumidores

Los estudios basados en los paneles de especialistas y test de consumidores no han obtenido resultados consistentes sobre la aceptabilidad de la carne con olor sexual. Según citan Malmfors y Lundström (1983), entre un 0% y un 35% de los consumidores europeos juzgan negativamente las propiedades sensoriales de la carne de cerdo entero, aunque la valoración difiere según el país considerado. El país que manifestó un nivel de aceptabilidad superior fue el Reino Unido, mientras que el porcentaje de reacciones desfavorables obtenidas aumentó, de forma considerable, en Alemania, Suecia y, principalmente, Francia (Desmoulin y col., 1982a, b). Estos autores también apuntaron que la frecuencia de respuestas negativas se incrementa cuando los consumidores reciben información sobre el producto evaluado. De acuerdo con estos resultados, Diestre y col. (1990) mostraron que la mayoría de los consumidores españoles rechazan la carne de cerdo entero que presenta un nivel elevado de olor sexual respecto las canales sin defecto sensorial.

Un estudio reciente desarrollado conjuntamente en siete países de la UE determinó que aproximadamente un 6,5% de los consumidores se muestran insatisfechos con el olor procedente de las canales de machos enteros en comparación a la carne procedente de hembras, aunque este porcentaje disminuyó ligeramente (aproximadamente hasta un 3%) cuando se evaluó el aroma global de las canales (Bonneau, 1998). La diferencia de aceptabilidad entre las canales de machos enteros y hembras fue muy baja en Gran Bretaña (aproximadamente de un 1,1%) y significativamente superior en España (10,2%) y Suecia (8,3%). Dijksterhuis y col. (1997) mostraron que los miembros del panel test seleccionado eran capaces de distinguir muestras de grasa dorsal con concentraciones elevadas de escatol de muestras de grasa procedentes de hembras o con concentraciones bajas de escatol y androstenona.

Annor-Frempong y col. (1997d) observaron en muestras de grasa de cerdo una mejor diferenciación entre concentraciones altas y bajas de escatol que entre concentraciones altas y bajas de androstenona. Además, también describieron diferencias significativas entre las puntuaciones sensoriales de muestras con distintas concentraciones de escatol (altas o bajas), pero concentraciones similares de androstenona. Annor-Frempong y col. (1997d) señalaron que las muestras de grasa con concentraciones bajas de escatol y elevadas de androstenona (BA) presentan una mayor intensidad de olor sexual respecto a

las categorías de concentración restantes (BB, AB, AA). Bejerholm y Barton-Gade (1993) y Andresen y col. (1993) obtuvieron resultados similares.

Dijksterhuis y col. (1997) señalaron que el conjunto de atributos elegidos en el estudio sensorial realizado recientemente en el ámbito europeo para la evaluación de muestras de cerdo facilitaron principalmente la percepción del escatol y, consecuentemente, los panelistas no detectaron la presencia de androstenona en concentraciones elevadas cuando el escatol se hallaba presente en condiciones similares. Matthews y col. (1997a) indicaron que los consumidores no distinguieron entre muestras procedentes de cerdos con concentraciones bajas de androstenona y escatol de muestras procedentes de hembras. El porcentaje de atributos negativos aumentó conforme las concentraciones de los compuestos implicados en el olor sexual, aunque los consumidores mostraron mayor sensibilidad al escatol.

#### 1.3.7. Contribución del escatol y de la androstenona al olor sexual

La contribución del escatol y de la androstenona al olor sexual se ha evaluado mediante test de consumidores y panel-test o panel de especialistas seleccionados por su capacidad de detectar la androstenona y el escatol (Thompson y Pearson, 1977; Walstra y col., 1986; Bonneau y col., 1992a, b; Berg y col., 1993; Hansen-Møller y Godt, 1995; Godt y col., 1996; Dijksterhuis y col., 1997; Matthews y col., 1997b).

Las variaciones en las respuestas de los consumidores entre los diferentes países no han permitido establecer la contribución real de cada compuesto (la androstenona, el escatol o ambos) a la percepción del olor sexual. En la actualidad se considera que la contribución específica de cada compuesto al defecto sensorial depende de los sistemas de producción (peso de sacrificio, genotipo de los animales) característicos de cada país, de las respuestas de los consumidores y de una evaluación sensorial distinta de la carne, según los hábitos culinarios característicos de los distintos países.

El estudio de la contribución del escatol y de la androstenona al olor sexual es esencial para el desarrollo de métodos analíticos que permitan la detección de las canales afectadas en la línea de sacrificio y para la evaluación de determinados procedimientos experimentales que reducen y controlan el desarrollo del olor sexual. Los coeficientes de correlación obtenidos entre la concentración de escatol y/o androstenona en grasa y los niveles de olor sexual se sitúan respectivamente entre 0,38-0,65 y 0,43-0,76 (Xue y col., 1996) e

indican que el escatol y la androstenona contribuyen significativamente a su desarrollo. Estudios realizados en Suecia (Hanson y col., 1980) atribuyeron un 50% de la variación del olor sexual a la combinación entre la androstenona y el escatol. Lundström y col. (1988) y Annor-Frempong y col. (1997d) obtuvieron porcentajes similares (un 56% y un 53,8%, respectivamente), aunque relacionaron la variación restante con la presencia de otros compuestos no identificados que también contribuirían al desarrollo del olor sexual.

En Dinamarca los cerdos se sacrifican a un peso aproximado de 70 kilos y se considera que es el escatol el compuesto que contribuye de forma más significativa al desarrollo del olor sexual (Godt y col., 1996). En este país, la determinación en la línea de sacrificio de escatol en grasa se utiliza para descartar las canales de cerdos enteros que presentan olor sexual. Mortensen y Sørensen (1984) describieron una correlación entre los niveles de olor sexual determinados mediante panel test y la concentración de escatol en grasa de aproximadamente 0,70, valor similar al descrito por Bejerholm y Barton-Gade (1993). Estos autores también evaluaron los porcentajes de variación en la apreciación del olor sexual atribuibles a la androstenona, al escatol o a ambos compuestos mediante análisis de regresión múltiple. Los resultados indicaron que la androstenona justifica un 24% de las variaciones observadas en las puntuaciones sensoriales y el escatol un 58%, aunque este último porcentaje aumenta aproximadamente hasta un 66% y un 71% al incluir en el modelo estadístico la presencia de la androstenona y de la androstenona e indol, respectivamente.

Lundström y col. (1988) mostraron que la concentración de escatol se correlaciona positivamente con los niveles de olor sexual en grasa ( $r=0,65$ ), músculo ( $r=0,68$ ) y con el sabor amargo del magro detectado en algunas canales ( $r=0,45$ ). La androstenona presentó una correlación similar, aunque ligeramente inferior en grasa ( $r=0,53$ ) y no se correlacionó con los parámetros sensoriales del músculo ( $r=0,20$  y  $r=0,25$ , respectivamente). Estudios recientes desarrollados en Noruega han obtenido resultados similares. Andresen y col. (1993) señalaron que los niveles de escatol presentan una mayor correlación con los atributos sensoriales que describen el olor sexual tanto en tejido adiposo como en músculo y los miembros del panel test manifestaron un mayor desagrado frente a las muestras de concentraciones altas o bajas de escatol respecto a las muestras de concentraciones altas o bajas de androstenona.



Berg y col. (1993) y LeDenmat y col. (1993) apuntaron que la contribución del escatol y de la androstenona al olor sexual depende del peso de sacrificio de los animales. Así, la determinación del escatol en grasa sería suficiente para discriminar las canales con defecto sensorial cuando el peso de sacrificio es bajo, pero la determinación de ambos compuestos sería necesaria cuando los animales son sacrificados a pesos superiores.

Existen discrepancias sobre la contribución del indol al olor sexual. Hanson y col. (1980) consideraron que el indol no contribuye significativamente al desarrollo de este defecto sensorial, porque su inclusión en los análisis de regresión múltiple no modifica el coeficiente de determinación del olor sexual. Moss y col. (1993) obtuvieron resultados similares. No obstante, Nute y col. (1995) y Annor-Frempong y col. (1997c) describieron una contribución significativa del indol en el desarrollo del olor sexual en muestras con concentraciones bajas de escatol ( $< 0,20 \mu\text{g/g}$ ) y elevadas de indol. Hanson y col. (1980) mostraron una correlación entre el contenido de escatol e indol de 0,8 y Annor-Frempong y col. (1997d) obtuvieron resultados similares ( $r=0,77$ ).

Estudios realizados en Francia mostraron resultados opuestos. Bonneau y col. (1992a, 1993a) señalaron que la contribución de la androstenona al olor sexual en carne de cerdos enteros es superior a la del escatol. La correlación entre la concentración de androstenona y la valoración del olor sexual fue similar a la descrita por Lundström y col. (1988), aunque la correlación con el escatol fue inferior ( $r=0,38$  en comparación a  $r=0,68$ ). La notable contribución de la  $5\alpha\text{-An}$  al olor sexual observada por estos autores puede explicarse por las condiciones de producción francesas, donde un 10% de los cerdos sacrificados presentan concentraciones elevadas de escatol y un tercio de los animales presentan niveles altos de androstenona. No obstante, esta conclusión no puede extenderse a otros países con sistemas de producción distintos, donde las respuestas y preferencias de los consumidores son también distintas (Bonneau y col., 1992a, b, 1993a).

La interacción entre la androstenona y el escatol descrita en diversos estudios se relaciona con la existencia de un efecto sinérgico entre ambas sustancias, principalmente cuando se presentan a concentraciones elevadas (Godt y col., 1996). Bonneau y col. (1992a, 1993a) indicaron un coeficiente de correlación de 0,73 entre la concentración de androstenona y escatol. Stern y col. (1992) y Hennessy y col. (1995a) describieron unos valores significativamente inferiores ( $r=0,15$  y  $r=0,24$ , respectivamente), mientras que Hanson y col. (1980),

Lundström y col. (1988), Andresen y col. (1993), LeDenmat y col. (1993), Bejerholm y Barton Gade (1993), Hansen-Møller y Andresen (1994) y Annor-Frempong y col. (1997d) mostraron coeficientes de correlación intermedios (0,32-0,54). No obstante, Babol y col. (1996) no observaron una interacción entre la concentración de escatol y de los 16-androstenos y sugirieron una participación independiente de estos compuestos en el desarrollo del olor sexual.

La variabilidad de los resultados presentados obedece a las diferencias en la concentración de androstenona y escatol de los animales y a las diferentes metodologías utilizadas en la preparación de las muestras para su posterior análisis sensorial, incluyendo la selección y entrenamiento de los miembros del panel. Además, se considera que los procesos de transformación y/o elaboración de productos derivados modifican la aceptabilidad de las canales que presentan olor sexual y afectan la contribución de cada compuesto al desarrollo de olores y aromas desagradables (ver apartado 1.3.9).

Agerhem y Tornberg (1995) evaluaron el perfil de aromas obtenido en muestras de músculo *Longissimus* a diferentes temperaturas internas de cocción (68°C y 80°C). La evaluación sensorial de las muestras de lomo indicó una mayor influencia del escatol a 68°C, mientras que la contribución de la androstenona fue superior cuando la temperatura interna de cocción fue de 80°C. La valoración del aroma, que incluía atributos sensoriales utilizados para identificar el olor sexual (*olor a cerdo, orina, establo, estiércol, naftalina, agrio, rancio, pintura, dulce*), fue distinta según la temperatura de las muestras. A 68°C, el aroma a pintura y a rancio se atribuyeron a la presencia de escatol, mientras que el olor a orina se relacionó con la interacción entre la androstenona y el escatol. Los atributos descritos a 80°C, como el olor a orina y a rancio, se relacionaron con el contenido de androstenona, mientras que determinados descriptores sensoriales, como el dulce, se atribuyeron a la presencia de escatol. Nute y col. (1995) obtuvieron resultados similares al evaluar el efecto de la temperatura a 65°C, 72,5°C y 80°C. Según los resultados de estos autores, al aumentar la temperatura final de cocción disminuyó la intensidad de los olores evaluados como negativos por un panel entrenado para detectar el olor sexual (*orina, estiércol, establo, naftalina*) y aumentó el aroma a cerdo.

Siret y col. (1997a) evaluaron la influencia de los procedimientos de cocción en la evaluación del olor sexual. La aceptabilidad de las muestras de carne preparadas en un horno a 250°C fue significativamente menor que las muestras

cocidas en una paella eléctrica a temperaturas inferiores. La valoración de los atributos sensoriales seleccionados (*cerdo, orina, establo, naftalina, rancio y sudor*) permitió un mayor grado de discriminación entre las muestras procedentes de hembras y el resto de grupos considerados (canales de cerdos enteros con distintas concentraciones de androstenona y escatol) cuando se cocinaron en un horno. McCauley y col. (1997) mostraron que la percepción del olor sexual es inferior cuando la carne de cerdo se macera antes de cocerla en el horno a temperaturas elevadas.

La contribución de los androstenoles al olor sexual se ha evaluado en diferentes estudios. Brennan y col. (1986) observaron que la concentración total de  $5\alpha$ -An- $3\alpha$ -ol y  $5\alpha$ -An- $3\beta$ -ol en el tejido adiposo, que representa aproximadamente un 45% de la concentración total de androstenona en este tejido, permite explicar algunas de las variaciones del olor sexual. La correlación entre la concentración suma de los androstenoles y la intensidad del olor sexual fue ligeramente superior a la observada para la androstenona (0,50 en comparación a 0,41), aunque la correlación observada entre la concentración de ambos esteroides ( $r=0,71$ ) dificulta establecer con exactitud su contribución individual al defecto sensorial.

El escatol y los esteroides contribuyen de forma significativa al desarrollo del olor sexual, pero factores relacionados con la madurez sexual también pueden incidir sobre el desarrollo de este defecto sensorial (Babol y col., 1995). Babol y col. (1996) describieron un coeficiente de correlación elevado entre la valoración del olor sexual y el tamaño de las glándulas bulbouretrales y salivares ( $r=0,60$  y  $r=0,61$ , respectivamente). Además, los niveles de 16-androstenos en las glándulas salivares presentaron una mayor correlación con el desarrollo del olor sexual que los niveles de escatol en grasa y el análisis sensorial mostró una menor aceptabilidad de los consumidores frente a la carne procedente de cerdos que presentan niveles elevados de 16-androstenos en glándulas salivares (superiores a  $55 \mu\text{g/g}$ ), respecto a la carne procedente de hembras.

La percepción de los consumidores del olor sexual presenta un factor de variabilidad individual y temporal importante. A diferencia del escatol al que todos los individuos son sensibles, la disposición de detectar androstenona está limitada a un grupo de personas sensibles sensorialmente a este compuesto y que posiblemente poseen receptores sensoriales específicos a esta sustancia. Así, la valoración de los consumidores diferirá según su capacidad de percibir la androstenona; las personas sensibles consideran que la contribución de la

androstenoa al olor sexual es más significativa que la del escatol, mientras que los consumidores anósmicos considerarán que el escatol es la principal sustancia responsable del defecto sensorial (Claus y col., 1994).

La proporción de consumidores anósmicos a la androstenoa varía entre diferentes zonas del mundo y es inferior entre la población femenina. Un estudio reciente realizado a escala mundial en el que colaboraron, aproximadamente, 1,5 millones de participantes mostró diferencias significativas entre zonas geográficas y dentro de una misma región. El porcentaje de personas anósmicas representó aproximadamente un 25% de los hombres y un 17% de las mujeres en Europa, Asia y Australia, un 37,5% de los hombres y un 29,5% de las mujeres en Estados Unidos y un 30% de los hombres y un 20,9% de las mujeres en el Reino Unido ( Weiler y col., 1997).

Weiler y col. (1997) obtuvieron resultados similares en un estudio realizado en Alemania. El escatol e indol fueron detectados aproximadamente por un 100% y un 30%, respectivamente, de las personas evaluadas sin observarse diferencias entre sexos. No obstante, la androstenoa y el  $5\alpha$ -androst-16-en-3 $\alpha$ -ol no fueron detectados por un 30,2% y un 32,6% de los hombres y un 19,2% y un 27,3% de las mujeres, respectivamente. La diferente sensibilidad observada en la percepción de estos compuestos se traduce en una elevada variabilidad en la aceptación de los productos en estudios realizados con consumidores, principalmente en muestras que presentan concentraciones elevadas o medias de androstenoa en combinación con concentraciones bajas de escatol.

Por último, la carne procedente de machos enteros con concentraciones bajas de androstenoa y escatol no presenta el mismo nivel de aceptabilidad que la carne procedente de cerdos castrados o hembras (Bonneau y col., 1993a; De Vries y Walstra., 1993) y, en consecuencia, la determinación de la androstenoa, del escatol o de ambos compuestos no es suficiente para discriminar las canales que presentan olor sexual. Los resultados descritos indican la presencia en las muestras de grasa de compuestos no identificados responsables del desarrollo de aromas desagradables o que contribuyen a la detección del olor sexual. De Vries y Walstra (1993) evaluaron el perfil de aromas de muestras de grasa de cerdo entero mediante técnicas de *Head Space* dinámico acopladas a un sistema de olfacción (*Snifing*). Los panelistas describieron algunos aromas que recordaron a *cloro*, *hierba*, *setas* y *limón*, entre otros, pero también describieron atributos sensoriales relacionados con el olor sexual (*moho*, *establo*, *orina*, *jabón*) en algunas de las muestras evaluadas.

### 1.3.8. Prevención

Numerosos estudios han mostrado que la castración de los animales, antes de la madurez sexual, es un método efectivo para evitar la aparición del olor sexual. Sin embargo, en los últimos años se han desarrollado numerosas investigaciones para encontrar alternativas a esta práctica por los inconvenientes que presenta.

#### 1.3.8.1. Reducción del escatol

La vida media del escatol en el tejido adiposo es aproximadamente de 10 horas (Friis, 1993) y, en consecuencia, los tratamientos desarrollados para disminuir su concentración en grasa son efectivos en un periodo de una semana.

Los niveles de escatol en el tejido adiposo pueden reducirse modificando la composición de la dieta y controlando las condiciones higiénicas en las que permanecen los animales, principalmente durante los meses más calurosos (apartados 1.3.2.1.1. y 1.1.1.1.1. ). La existencia de un gen que controla los niveles de escatol (Lundström y Malmfors, 1993) que se expresa fenotípicamente bajo ciertas condiciones ambientales dificulta los estudios de selección genética para la producción de animales con niveles aceptables de escatol en grasa.

Ender y col. (1995) observaron una disminución significativa de la concentración de escatol (33%) al adicionar en la dieta de los animales el suplemento *De-Odorasa*, un componente del extracto de *Yucca* que presenta la capacidad de unirse en el intestino a los grupos NH del escatol y de los compuestos derivados y evita su posterior acumulación en el tejido adiposo. El tratamiento aplicado no modificó la conformación de las canales ni la calidad de la carne, aunque los animales presentaron un mayor engorde diario, ocasionado posiblemente por una menor pérdida de nitrógeno.

#### 1.3.8.2. Reducción de la concentración de androstenona en el tejido adiposo

Estudios de selección genética han confirmado que la concentración de androstenona en grasa presenta un importante componente hereditario, con unos índices de heredabilidad superiores a 0,50. Bonneau (1982) indicó que en numerosos trabajos de selección genética de líneas porcinas con concentraciones bajas de androstenona se observan resultados positivos en la tercera generación. En un estudio de características similares, Sellier y col.

(1993, 1997) observaron un aumento del tamaño y peso de las glándulas bulbouretrales, especialmente a partir de la tercera generación.

La selección genética es, por tanto, una solución prometedora para controlar y reducir el desarrollo del olor sexual asociado a la androstenona, pero puede presentar consecuencias adversas en el desarrollo sexual de los animales y en la conformación de las canales, a causa de la proximidad entre el metabolismo de los  $C_{19}\text{-}\Delta^{16}$ -esteroides y de las hormonas sexuales masculinas (LeRoy y col., 1997) y es necesario, por tanto, establecer unos índices de selección apropiados para no alterar las características morfológicas de las canales.

Numerosos estudios han evaluado la posibilidad de autoinmunizar cerdos enteros contra la androstenona o contra sus precursores inmediatos, estimulando el sistema inmunitario de los animales mediante la administración de anticuerpos específicos que permanecerían en sangre a concentraciones elevadas hasta el momento del sacrificio. No obstante, el bajo peso molecular de la androstenona determina que la respuesta inicial del sistema inmunológico del animal sólo se consiga cuando se une a una proteína transportadora. Los resultados obtenidos mostraron que la inmunización de los animales permitió una disminución de la concentración de androstenona sin afectar la síntesis de andrógenos y estrógenos, aunque no fue suficiente para evitar la presencia de olor sexual de las canales en la mayoría de los estudios realizados.

Williamson y col. (1985) evaluaron la capacidad inmunogénica de la androstenona conjugada con la seroalbúmina bovina (BSA) en la posición C-3 (androstenona-3-BSA). La concentración de androstenona en grasa fue inferior en los animales inmunizados respecto a los cerdos control, especialmente a pesos de sacrificio bajos (90-95 kilos) y el porcentaje de canales con concentraciones de androstenona inferiores a  $1 \mu\text{g/g}$  fue superior en los cerdos inmunizados.

Brooks y col. (1986) desarrollaron un procedimiento de autoinmunización contra la producción de 5,16-androstadien-3 $\beta$ -ol y 4,16-androstadien-3-ona. Los cerdos inmunizados presentaron una concentración de androstenona en el tejido adiposo inferior a los cerdos del grupo control sin modificar las características conformacionales de las canales. Los niveles de olor sexual estimados por los miembros de un panel test también fueron inferiores en las muestras de grasa procedentes de las canales de cerdos inmunizados.

Patterson y col. (1987) evaluaron la respuesta inmunológica de los cerdos contra la androstenona conjugada a una proteína transportadora de mayor peso molecular, la *Keyhole limpet hemocianina* (KLH). La concentración media de androstenona no fue significativamente diferente entre los animales inmunizados y los animales control, aunque el porcentaje de canales con concentraciones de androstenona inferiores a 1 µg/g fue superior en los animales inmunizados (40%) en comparación a los animales control (11%).

#### 1.3.8.3. Reducción de la concentración de androstenona y escatol en grasa

La administración de andrógenos (100-300 mg) reduce la actividad endocrina de los testículos, debido a la atrofia de sus tejidos y al bloqueo de la biosíntesis por mecanismos de retroinhibición. López-Bote y Ventanas (1988) observaron que la administración de testosterona en cerdos recién nacidos disminuye la concentración de testosterona en suero y los niveles de olor sexual determinados mediante el método de Jarmoluk y col. (1970) sin modificar las características conformacionales de las canales. Estos autores describieron un incremento del grado de saturación de la grasa, similar al descrito por Desmoulin (1983) en cerdos castrados. López-Bote y col. (1990) describieron resultados similares al administrar trembolona a cerdos enteros y asociaron el incremento en la concentración de indol y escatol en grasa de estos animales con la influencia del andrógeno administrado sobre el metabolismo hepático de los compuestos indólicos.

La biosíntesis de  $C_{19}-\Delta^{16}$ -esteroides también se reduce interfiriendo en los efectos de las hormonas del sistema endocrino, que son las que controlan su producción en los testículos. La síntesis y/o liberación de estas hormonas se controla de un modo jerárquico. El hipotálamo, situado en la base del cerebro, recibe mensajes nerviosos específicos y secreta unas sustancias denominadas factores liberadores que, a través de las fibras nerviosas, llegan a la glándula pituitaria anterior y provocan la liberación de una determinada hormona. Las hormonas liberadas por la pituitaria anterior se transportan a través de la sangre hasta la glándula que constituye su blanco. De este modo, generando anticuerpos contra la hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH), que regula la liberación de la hormona luteinizante (LH), es posible bloquear la producción de esteroides y obtener una concentración de androstenona en grasa inferior al umbral a partir del que se considera que las canales pueden ser rechazadas para el consumo de carne fresca. Falvo y col. (1986), Bonneau y col. (1993b, 1994),

Boghossian y col. (1994) y Hennessy y col. (1995b) señalaron que la inmunización contra LHRH y LH disminuye la incidencia del olor sexual sin afectar las características conformacionales de las canales. Dufour y col. (1993) observaron que la concentración de androstenona es inferior en los cerdos inmunizados (0,21 µg/g) respecto a los cerdos control (0,66 µg/g). En este estudio, los animales recibieron una primera inmunización que provocó una respuesta inmunológica moderada y que permitió una inhibición de la actividad testicular mínima para que los cerdos se desarrollasen y presentasen las ventajas de los cerdos enteros. La administración de una segunda vacuna se efectuó dos semanas antes del sacrificio para disminuir la concentración de androstenona hasta unos niveles aceptables. Sin embargo, los efectos que ejerce la inmunocastración mediante antígenos contra LHRH sobre la concentración de escatol no están establecidos. Dufour y col. (1993) no observaron diferencias significativas entre los diferentes grupos estudiados, mientras que Boghossian y col. (1994) y Hennessy y col. (1995b) mostraron que los niveles de escatol de los animales inmunizados son comparables a los observados en los cerdos castrados y hembras.

Awoniyi y col. (1988), Manns y col. (1995), Dufour y col. (1995) y Manns y Robbins (1997) constataron que la inmunización contra la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) produce una barrera inmunológica entre el hipotálamo y la pituitaria, bloqueando la liberación de LH, hormona que estimula la producción testicular de testosterona y de los androstanos. Manns y Robbins (1997) describieron concentraciones de androstenona en animales inmunocastrados inferiores a 0,5 µg/g y un mayor porcentaje de magro en las canales, que permitiría un incremento del peso de sacrificio y, por tanto, mayores beneficios económicos en determinados sistemas de producción. En estos estudios, los niveles de escatol obtenidos fueron inferiores respecto a los cerdos enteros. Por otra parte, el tamaño y peso de los testículos disminuyó significativamente en los cerdos tratados (22 gramos) en comparación a los cerdos control (287 gramos), lo que permitió evaluar fácilmente la eficacia del tratamiento en la línea de sacrificio (Onk y col.,1993).

Xue y col. (1993, 1994), Dufour y col. (1995) y Schneider y col. (1995) observaron que la inyección de un agonista de GnRH a cerdos enteros estimula la secreción de LH y aumenta la concentración de testosterona en suero que posteriormente disminuye hasta los niveles iniciales. No obstante, la administración de dosis elevadas atrofió las células de *Leydig* y disminuyó



la producción de esteroides en los testículos, observándose una disminución de la concentración de androstenona en grasa y glándulas salivares. En estos estudios, la concentración de escatol no presentó diferencias significativas entre los cerdos inmunizados y los cerdos control. El tratamiento desarrollado resultó efectivo en la eliminación del olor sexual asociado a la presencia de  $C_{19}-\Delta^{16}$ -androstenos esteroides sin modificar las características conformacionales de las canales ni la calidad de la carne.

Hennesy y col. (1997) desarrollaron una nueva vacuna contra el factor liberador de las hormonas gonadotropinas (GnRF) y observaron una disminución de la función testicular y del tamaño de los órganos sexuales. Los niveles de olor sexual determinados según la concentración de androstenona y escatol en grasa disminuyeron por debajo de los niveles detectables y sólo un 0,6% de los animales tratados presentaron una concentración intermedia de ambos compuestos.

La administración de somatotropina o hormona del crecimiento a cerdos enteros disminuyó la concentración de androstenona en el tejido adiposo y modificó el intervalo de concentraciones de la  $5\alpha$ -An, aumentando la proporción de canales que presentaban unos niveles inferiores al límite de aceptabilidad establecidos (Bonneau y col., 1992c y 1993c). La concentración de escatol en grasa y la síntesis de andrógenos o estrógenos no mostró diferencias entre los cerdos tratados y los cerdos control. Contrariamente, las canales presentaron una mejor eficiencia de conversión del alimento ingerido y un mayor porcentaje de magro.

El control del olor sexual mediante la utilización de vacunas específicas posibilitaría el uso de machos enteros en la industria cárnica sin tener que recurrir a la práctica de la castración. Desde un punto de vista comercial, las vacunas deben ser económicas, efectivas y seguras para el consumidor y el animal. Sin embargo, esta alternativa a la castración no siempre es efectiva y, en determinadas ocasiones, la producción de anticuerpos es insuficiente para permitir una reducción de la concentración final de androstenona en el tejido adiposo. La administración de dosis inadecuadas durante un periodo de tiempo insuficiente, el estrés o las enfermedades inmunodepresivas son los principales factores que se relacionan con la falta de respuesta inmunológica. Otro aspecto importante que también debe considerarse es el periodo de tiempo que transcurre entre la última vacunación y el sacrificio para favorecer que los niveles de esteroides anabólicos se mantengan elevados y permitan un correcto desarrollo conformacional de las canales. Al

mismo tiempo, la inmunocastración debe asegurar una disminución de la concentración de androstenona hasta niveles aceptables. Por otra parte, es necesario ampliar los estudios en los anticuerpos suministrados para evitar las reacciones cruzadas con otros compuestos que pudieran provocar efectos secundarios indeseables y desarrollar vacunas efectivas que permitan disminuir su dosificación en el tiempo (Oonk y col., 1993, 1995).

#### 1.3.9. El olor sexual en los productos derivados

Las reacciones de los consumidores frente al olor sexual dependen del producto cárnico que se evalúa y, por tanto, de los hábitos culinarios, de las costumbres alimenticias y de los diferentes procesos tecnológicos aplicados en los países. En general, los procesos de transformación pueden disminuir o enmascarar el olor sexual y mejorar el nivel de aceptabilidad de la carne y su calidad sensorial (Bonneau y col., 1980; Malmfors y Lundström, 1983).

El grupo de trabajo sobre la *Utilización y producción de carne de cerdos no castrados de la Federación Europea de Zootecnia* señala que la venta de carne fresca con concentraciones inferiores a 0,50 µg/g de androstenona no presenta riesgos de generar una respuesta negativa de los consumidores. No obstante, en canales destinadas a la elaboración de derivados cárnicos que apliquen temperaturas elevadas de fabricación se aceptan unos umbrales de concentración superiores, a consecuencia de una posible pérdida durante los procesos de transformación de la androstenona depositada en el tejido adiposo (Walstra, 1974; Desmoulin y col., 1981, 1982b). Según Bonneau y col. (1992b), los umbrales para el escatol y la androstenona en jamón cocido son 0,75 µg/g y 1,50 µg/g, respectivamente, unas tres veces superiores a los obtenidos en la evaluación sensorial de la carne de cerdo fresca. La proporción de consumidores que juzgan negativamente los productos curados varía entre un 2-10%, y se eleva hasta un 632% en los productos elaborados a partir de carne de cerdo entero (Malmfors y Lundström, 1983).

El jamón curado es uno de los productos cárnicos españoles de mayor importancia económica. La producción anual se eleva a  $20 \times 10^6$  unidades, mayoritariamente procedentes de jamones de cerdo blanco. El proceso de elaboración comprende básicamente las etapas de salado, reposo o post-salado y secado/maduración y supone una duración de 7 a 12 meses. La temperatura del proceso no supera los 25°C. El olor sexual no se detecta fácilmente en los productos que se consumen en frío, pero se considera que el jamón se calienta

en la cavidad bucal durante el proceso de masticación y el olor sexual se percibe retronasalmente. Diversos estudios han constatado la importancia del olor sexual en la calidad del jamón curado. Arnau y col. (1986) y Diestre y col. (1990) mostraron que los consumidores y catadores entrenados rechazan jamones con concentraciones de androstenona superiores a 1  $\mu\text{g/g}$ . El umbral de detección descrito para el escatol fue de 0,1  $\mu\text{g/g}$  en jamón curado (Arnau y col., 1987). La evaluación sensorial de jamones curados elaborados a partir de cerdos enteros mostró que la incidencia e intensidad del aroma a orina se relaciona mayoritariamente con el contenido de androstenona (Bonneau y col., 1992b, 1993a). No obstante, los atributos sensoriales restantes mostraron una mejor correlación con el contenido de escatol. Los resultados descritos indican que resulta difícil concluir que compuesto se correlaciona mejor con las propiedades sensoriales del jamón curado.

En otros países europeos los procesos tecnológicos aplicados en la elaboración de jamón son totalmente distintos. Después del periodo de salado, los jamones se cuecen en moldes hasta una temperatura interna de 67°C, aproximadamente. Desmoulin y col. (1981, 1982b) no observaron diferencias significativas entre el olor, aroma y aceptabilidad de los jamones elaborados a partir de cerdos enteros con olor sexual o cerdos control, pero señalaron una mayor proporción de reacciones desfavorables en aquellas canales que presentan concentraciones de escatol y androstenona elevadas. Según Diestre y col. (1990), los consumidores no manifestaron respuestas distintas en la evaluación sensorial de jamones procesados en caliente, pero presentados al panel para su consumo en frío, procedentes de canales de cerdos enteros o de hembras.

Clipléf y col. (1984) determinaron que la concentración de androstenona en jamones frescos es significativamente superior en grasa (14,02  $\mu\text{g/g}$ ) en comparación al tejido muscular (8,17  $\mu\text{g/g}$ ). No obstante, cuando estos mismos jamones se sometieron a procesos de ahumado y curado, se observó que la concentración de androstenona en el tejido adiposo disminuye hasta unos valores de 6,44  $\mu\text{g/g}$ . Los estudios realizados mediante paneles de consumidores mostraron que no existen diferencias significativas entre los productos elaborados a partir de cerdos enteros o castrados, aunque los consumidores prefieren, mayoritariamente, la carne procedente de los animales castrados.

El bacon es otro de los productos curados que puede obtenerse a partir de canales de cerdos. A diferencia del jamón curado, el tiempo de procesado es menor (5 días), es ahumado aproximadamente durante 30 minutos a 35°C y se consume en caliente. Diestre y col. (1990) observaron que los consumidores valoran negativamente las propiedades sensoriales del bacon elaborado a partir de cerdo entero, incluso cuando la concentración de androstenona es inferior a 1 µg/g. McCauley y col. (1997) señalaron que el jamón cocido presenta un mayor grado de aceptabilidad en comparación al bacon, debido posiblemente a la temperatura a la que se consume, y la percepción de los atributos sensoriales asociados al olor sexual depende de la temperatura de consumo.

En productos elaborados a partir de carne picada (salchichones, chorizos, salami) el nivel de olor sexual puede diluirse con carne procedente de hembra o enmascararse mediante el ahumado o la adición de especias, como la pimienta, el ajo o el hinojo (Malmfors y Lundström, 1983; Diestre y col., 1990). McCauley y col. (1997) observaron que el grado de aceptabilidad del salami es superior al del jamón y bacon, porque la adición de especias y aditivos dificulta la percepción del defecto sensorial. No obstante, las condiciones exactas a las que debe someterse la carne procedente de las canales afectadas por el olor sexual necesitan ser evaluadas para cada una de las distintas variedades de los productos preparados a partir de carne de cerdo. Walstra (1974) indicó que aproximadamente un 25% de carne fresca con un elevado grado de olor sexual puede utilizarse en la elaboración de embutidos curados consumidos en frío.

Siret y col. (1995) evaluaron la concentración umbral de androstenona aceptada por los miembros de un panel de consumidores en el *pâté de campagne*. La aceptabilidad del producto que presentaba diferentes concentraciones de androstenona (0,97, 1,70, 2,73 µg/g) fue inferior en comparación al *pâté* control elaborado a partir de grasa de cerdo con concentraciones de 5 $\alpha$ -An inferiores a 0,5 µg/g. Los atributos sensoriales asociados al producto elaborado fueron mayoritariamente: *gusto desagradable*, *orina* y *sudor*. La intensidad del olor sexual evaluada por los miembros de un panel entrenado disminuyó significativamente cuando la grasa de cerdo se coció previamente a temperaturas elevadas.

Siret y col. (1997b) determinaron la percepción del olor sexual durante la cocción de chicharrones elaborados a partir de grasa procedente de hembras o de machos enteros con diferentes concentraciones de androstenona y escatol. Los panelistas manifestaron un mayor desagrado frente los productos con

concentraciones elevadas de ambos compuestos y atributos sensoriales, como el olor a *orina*, *establo*, *naftalina*, entre otros, se correlacionaron mediante análisis sensorial con el grupo de muestras que presentaron concentraciones elevadas de androstenona y escatol.

## OBJETIVOS

El olor sexual es uno de los defectos sensoriales asociado a las canales de cerdos enteros con un importante impacto económico a nivel europeo. Los métodos analíticos desarrollados para determinar la concentración de escatol y androstenona en muestras de grasa son, en general, laboriosos, debido a que requieren procedimientos de purificación complejos que limitan su aplicabilidad en la línea de sacrificio y el número de muestras a procesar. La incidencia del olor sexual depende de numerosos factores como: la genética, la alimentación y las condiciones ambientales, entre otros. El desarrollo de métodos analíticos rápidos y aplicables en el laboratorio permite una mejor evaluación de su influencia sobre la concentración de androstenona y escatol en grasa.

Los objetivos planteados en el presente trabajo de tesis son:

1. Desarrollo de metodologías analíticas rápidas que permitan determinar la concentración de escatol e indol en muestras de grasa dorsal de cerdos enteros sin necesidad de purificar los extractos grasos obtenidos.
2. Desarrollo de metodologías analíticas que permitan determinar de forma simultánea la concentración de androstenona y androstenoles en grasa dorsal de cerdo.
3. Desarrollo de metodologías analíticas que permitan evaluar la concentración de escatol e indol en músculo *longissimus dorsi* de cerdo.
4. Estudio del perfil de volátiles obtenido en muestras de grasa de cerdo con distintas concentraciones de escatol y androstenona mediante técnicas de *Head Space* dinámico para evaluar la contribución de los compuestos volátiles identificados en el aroma de muestras de grasa con diferentes características sensoriales.
5. Evaluación del porcentaje de ácidos grasos totales en muestras de grasa dorsal de cerdo con distintas concentraciones de androstenona y escatol.
6. Estudio de la contribución al olor sexual de los compuestos aislados de la grasa dorsal de cerdos enteros con concentraciones bajas de escatol y androstenona y evaluadas sensorialmente con olor sexual.

## **CAPITULO II**

*Material y Métodos*

## 2.1. Aparatos y Reactivos

Los reactivos utilizados fueron de la calidad exigida para cada aplicación. Así, para el análisis mediante HPLC se emplearon disolventes de grado HPLC que fueron previamente filtrados (0,45  $\mu\text{m}$ ) y desgasificados mediante ultrasonidos. Los disolventes empleados en la extracción de las muestras fueron de grado para análisis y los utilizados en los procesos de purificación de grado para residuos.

Los patrones de indol, escatol, 5 $\alpha$ -An, 5 $\alpha$ -An-3 $\alpha$ -ol, 5 $\alpha$ -An-3 $\beta$ -ol, 7-etilindol, 5 $\alpha$ -androstano-3-ona y 5 $\alpha$ -androstano-3 $\alpha$ -ol se obtuvieron en Sigma (USA). Para la purificación de los extractos mediante cromatografía en fase sólida se utilizó sílica gel 60 con un tamaño de partícula de 0,063-0,200 mm (Merck) y minicolumnas aminopropilsilica de 500 mg (Varian) y octadecilsilica de 600 mg (Baker Bond). Las columnas cromatográficas se adquirieron a diferentes proveedores: columnas HPLC Hypersil APS-2 (250 x 4,6 mm, con un tamaño de partícula de 5  $\mu\text{m}$ ), Hypersil APS-2 (100 x 4,6 mm, con un tamaño de partícula de 3  $\mu\text{m}$ ) y octadecilsilica (150 x 4 mm, con un tamaño de partícula de 5  $\mu\text{m}$ ) (Teknokroma, Barcelona); columnas CGC FSOT 5% fenilmetilsilicona (DB-5) 15 m x 250  $\mu\text{m}$  con un espesor de film de 0,25  $\mu\text{m}$  (J & W, USA); FSOT 5% fenilmetilsilicona (DB-5) 40 m x 180  $\mu\text{m}$  con un espesor de film de 0,4  $\mu\text{m}$  (J & W, USA); FSOT 5% fenilmetilsilicona (DB-5) 30 m x 250  $\mu\text{m}$  con un espesor de film de 0,25  $\mu\text{m}$  (J & W, USA) y FSOT 5% fenilmetilsilicona (DB-5) 20 m x 200  $\mu\text{m}$  con un espesor de film de 0,3  $\mu\text{m}$  (J & W, USA).

Los instrumentos utilizados fueron: cromatógrafos líquidos: LKB1: bomba 2150, controlador de gradiente 2151, inyector Rheodyne, detector espectrofotométrico UV-VIS 2151 190-400 nm; LKB2: bomba 2248, controlador de gradiente 2252; inyector automático HP 1100, detector de fluorescencia HP 1046A; LKB3: bomba 2150, controlador de gradiente 2151, inyector Rheodyne y fluorímetro SFM 25 (Kontron Instruments); Waters: bomba 600 para gradiente a baja presión, inyector U6K, detector hilera de diodos (diodo array) 990 190-600 nm; cromatógrafos de gases: Dani HR-3800 con inyector split/splitless y detector FID; HP-5890 series II con inyector automático split/splitless HP-7673 y detector FID; Carlo Erba de alta temperatura HRGC 5300-HT con inyector on-column y detector NPD. Una precolumna (retention gap) de tubo de sílice desactivado se empleó en el inyector on-column. Los equipos de cromatografía de gases y espectrometría de masas utilizados fueron: Hewlett Packard 5890-5970 equipado con inyector automático split/splitless y rango de masas 10-800 uam en modo de impacto electrónico (70



eV); Fisons 8000 equipado con inyector split/splitless y acoplado a un espectrómetro de masas (Trio 2000) con modo de impacto electrónico (70 eV) y rango de masas de 10-2000 uam.

Los datos se adquirieron mediante integradores (Spectra Physics, Carlo Erba strumentazione, HP 3394 y Schimadzu CR1B) y con ordenadores NEC APCIII, Hewlett Packard Vectra multimedia VL2 4/66 y Digital DECpc Lpv 466d2. Los programas informáticos utilizados fueron: ChemStation y MassLynx.

## 2.2. Selección de las muestras

### 2.2.1. Toma de muestras

Distintas muestras de grasa dorsal y de recubrimiento (grasa situada alrededor del músculo longissimus dorsi) y de músculo longissimus dorsi procedentes de canales comerciales de cerdos enteros se utilizaron en la validación de los métodos desarrollados para determinar la concentración de indol, escatol, androstenona y androstenoles y en la elaboración de rectas de calibración para determinar las concentraciones de los compuestos estudiados. Las muestras de grasa se seleccionaron de la zona de la espalda por similitud con las muestras de grasa utilizadas en el desarrollo del presente proyecto. Las muestras se homogeneizaron, se envasaron al vacío y se mantuvieron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de ser analizadas. Previamente, se comprobó que no presentaban concentraciones detectables de escatol, indol, androstenona y androstenoles.

### 2.2.2. Recogida de muestras

En el transcurso del proyecto europeo (AIR 3 PL942482) se produjeron un total de 4536 cerdos en seis de los siete países europeos participantes: Francia, Suecia, Dinamarca, Holanda, España y Reino Unido. Diferentes genotipos y sistemas de producción se incluyeron en el grupo de animales producido para asegurar su representatividad. Los animales fueron sacrificados en dos periodos distintos (verano 1995 e invierno 1995-1996) y las muestras seleccionadas correspondieron a la primera o segunda réplica, respectivamente. Las muestras de grasa se tomaron en la zona de la espalda porque presenta mayores concentraciones de los compuestos a estudiar y por su yuxtaposición a la zona del músculo longissimus dorsi que generalmente es la parte consumida o seleccionada para la elaboración de derivados cárnicos.

Las muestras de grasa se clasificaron previamente según la concentración de androstenona y escatol determinada mediante métodos analíticos rápidos desarrollados en laboratorios de Holanda (Instituto IDDLO) y Dinamarca (The Danish Meat Research Institute). La concentración de androstenona se determinó mediante el método ELISA (Claus y col., 1997a) según el procedimiento descrito en los kits comerciales (Riedel-de-Haen, Seelze, Alemania) y la de escatol según el método colorimétrico de Mortensen y Sørensen (1984) y Hansen-Møller y Andersen (1994). Los resultados obtenidos permitieron seleccionar un total de 377 cerdos enteros y 42 hembras, las cuales presentaron concentraciones de escatol y androstenona inferiores a 0,15 µg/g y 0,99 µg/g, respectivamente. El peso medio de las canales consideradas fue de 76,5 quilos y el porcentaje de magro de 57,9% (Walstra y col., 1997). Las muestras de grasa seleccionadas se analizaron también por métodos de cromatografía líquida y detección por fluorescencia en la Universidad de Hohenheim (Alemania). La determinación del escatol se realizó según el método descrito por Dehnhard y col. (1993) y la determinación de la androstenona según el método de Hansen-Møller (1994). Todos los análisis de un mismo compuesto se efectuaron en un mismo laboratorio para evitar posibles desviaciones en los niveles de los compuestos evaluados (Bonneau, 1997).

La selección de las muestras de grasa se realizó de acuerdo a unos criterios establecidos previamente. Según los datos facilitados por los métodos rápidos, las muestras de grasa se distribuyeron en una tabla de 9 celdas (3x3), representando 3 categorías de concentraciones de escatol y androstenona: baja (B), media (M) y alta (A). Los umbrales de concentración para cada uno de los compuestos se escogieron según datos publicados previamente en la bibliografía (Bonneau y Cook, 1997) y fueron:

Escatol: Baja  $\leq 0,10$  µg/g

Media 0,11-0,22 µg/g

Alta  $\geq 0,22$  µg/g

Androstenona: Baja  $\leq 0,50$  µg/g

Media 0,51-1,0 µg/g

Alta  $\geq 1,0$  µg/g

Las muestras de grasa que presentaron concentraciones elevadas de androstenona ( $>10 \mu\text{g/g}$ ) o de escatol ( $>1 \mu\text{g/g}$ ) se eliminaron previamente. Los niveles de escatol de una misma categoría y a través de las categorías de androstenona fueron similares. La misma consideración se estableció para los niveles de androstenona. Además, la concentración de androstenona y escatol entre los distintos países de producción no presentó diferencias.

Las muestras de grasa seleccionadas se evaluaron por paneles de especialistas y test de consumidores pertenecientes a siete países miembros de la Unión Europea (Alemania, Dinamarca, España, Francia, Holanda, Reino Unido y Suecia) para determinar la presencia o ausencia de olor sexual. La metodología utilizada para la preparación y presentación de las muestras, así como el entrenamiento de los panelistas y las condiciones ambientales durante las sesiones, se estandarizaron para minimizar las diferencias en la respuesta de los panelistas frente a la androstenona y al escatol (Agerhem y Dijksterhuis, 1995, 1997; Matthews y col., 1997b).

### 2.2.3. Análisis de los compuestos responsables del olor sexual en muestras de grasa. Selección de las muestras de grasa para el estudio de otros compuestos que puedan contribuir al olor sexual

Los grupos de concentración de escatol y androstenona y el número de muestras de grasa de cada grupo seleccionado para determinar las concentraciones de los compuestos implicados mediante métodos analíticos desarrollados durante la realización del presente trabajo de Tesis se presentan en la Tabla 2.1. También se seleccionaron un total de 6 muestras de grasa procedentes de canales de hembras. Además, en cada categoría seleccionada se incluyeron muestras de grasa con olor sexual y muestras de grasa que no presentaron defecto sensorial (muestras control).

Las muestras de grasa procedentes de cerdos enteros con concentraciones bajas de escatol y androstenona (muestras BB) y rechazadas sensorialmente por la presencia de olor sexual mediante un test de panelistas y de consumidores se analizaron para evaluar la presencia de compuestos que pudieran contribuir al desarrollo del olor sexual mediante métodos químicos.

Los resultados obtenidos se compararon con los datos facilitados por la Organización del proyecto referentes a la concentración de androstenona obtenida por ELISA (Claus y col., 1997a) y HPLC (Hansen-Møller, 1994) y a la

concentración de indol y escatol determinada por el método colorimétrico (Hansen-Møller y Andersen, 1994) y también por el de HPLC (Dehnhard y col., 1993). Asimismo, se evaluó la transferencia de escatol y androstenona a la fase vapor mediante técnicas de Head Space estático, el perfil de volátiles mediante técnicas de Head Space dinámico y el porcentaje de ácidos grasos totales en las muestras de grasa seleccionadas con distintas concentraciones de escatol y androstenona.

Tabla 2.1. Distribución de las muestras de grasa seleccionadas según la concentración de escatol y androstenona determinada mediante métodos rápidos (Claus y col., 1997a; Hansen-Møller y Andersen, 1994)

<b>ESCATOL (<math>\mu\text{g/g}</math>)</b>	<b>ANDROSTENONA (<math>\mu\text{g/g}</math>)</b>		
	$\leq 0,50$	0,51-1,0	$\geq 1,0$
$\leq 0,10$	BB (n=10)	BM (n=10)	BA (n=10)
0,11-0,22	MB (n=10)	MM (n=10)	MA (n=10)
$\geq 0,22$	AB (n=10)	AM (n=10)	AA (n=10)

B: concentraciones bajas; M: concentraciones medias; A: concentraciones altas

## 2.3. Métodos analíticos

### 2.3.1. Determinación de indol y escatol mediante HPLC-FN

#### 2.3.1.1. Extracción de indol y escatol de muestras de grasa

0,5 µg de 7-etilindol (patrón interno) se adicionaron a 1±0,01 gramos de grasa previamente homogeneizada. La extracción de los compuestos se efectuó con 7 ml de hexano:2-propanol (92:8). Las muestras se agitaron en un vórtex y se dejaron en reposo durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, los extractos se filtraron y se llevaron a un volumen final de 10 ml. Una alícuota del extracto se filtró (filtros de PTFE de 13 mm de diámetro y 0,45 µm de poro) antes de inyectarse en el cromatógrafo líquido. Las muestras se analizaron por duplicado.

La cuantificación de los compuestos respecto al patrón externo y la determinación del factor de respuesta del indol y del escatol respecto al patrón interno utilizado se realizó en muestras de grasa control fortificadas con cantidades conocidas de indol, escatol y 7-etilindol, según se presenta en la Tabla 2.2. Previamente, se comprobó que las muestras de grasa no presentaban cantidades detectables de indol y escatol.

#### 2.3.1.2. Extracción de indol y escatol de muestras de músculo longissimus dorsi

1,5 µg de 7-etilindol (patrón interno) se adicionaron a 5±0,01 gramos de músculo longissimus dorsi previamente picado. Las muestras se homogeneizaron con 20 gramos de sulfato sódico anhidro y, posteriormente, los compuestos se extrajeron en 100 ml de una mezcla de cloroformo:metanol (2:1) durante toda la noche. Los extractos se filtraron sobre sulfato sódico anhidro y se dispusieron en embudos de decantación, donde se adicionaron 40 ml de agua al 10% de sal. La fase orgánica se recogió y la fase acuosa se lavó con 2 x 50 ml de cloroformo. Las soluciones de cloroformo se reunieron, evaporaron a sequedad en un rotavapor y redisolviéron en 5 ml de hexano:2-propanol (92:8). Los extractos se filtraron (filtros de PTFE de 13 mm de diámetro 0,45 µm de poro) antes de ser inyectados en el cromatógrafo.

La linealidad y repetibilidad del método desarrollado se evaluaron en muestras de músculo *longissimus dorsi* a las que se añadieron cantidades conocidas de indol, escatol y 7-etilindol, según se muestra en la Tabla 2.3.

Previamente, se comprobó que las muestras de músculo no presentaban cantidades detectables de indol y escatol.

### 2.3.1.3. Condiciones cromatográficas

El análisis cromatográfico se efectuó del siguiente modo:

- Cromatógrafo líquido LKB que consta de:
  - Bombas de alta presión LKB 2150 y 2248 (0-350 bar)
  - Controlador de gradiente 2252
  - Inyector Rheodyne 7215 con *loop* de 100 µl e inyector automático HP 1100
  - Detector de fluorescencia HP 1046A y Fluorímetro Kontron
- Columnas: Hypersil APS-2 (250 mm x 4,6 mm, espesor de film de 5 µm)  
Hypersil APS-2 (100 mm x 4,6 mm, espesor de film de 3 µm)
- Fase móvil: hexano:2-propanol (92:8)
- Flujo: 1,5 ml/min
- Detección por fluorescencia:  $\lambda_{\text{excitación}}$  a 280 nm y  $\lambda_{\text{emisión}}$  a 360 nm
- Toma de datos: Integrador *Spectra Physics Chromjet*

### 2.3.2. Determinación de la androstenona y de los androstenoles en muestras de grasa dorsal de cerdo mediante GC-MS

#### 2.3.2.1. Extracción de los compuestos de muestras de grasa dorsal

2 µg de 5 $\alpha$ -androstan-3-ona (patrón interno de la androstenona) y 2 µg de 5 $\alpha$ -androstan-3 $\alpha$ -ol (patrón interno de los androstenoles) se adicionaron a 1±0,01gramos de grasa dorsal de cerdo previamente picada. La extracción de los compuestos estudiados se realizó en 30 ml de diclorometano durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los extractos se filtraron sobre sulfato sódico anhidro y se llevaron a un volumen final de 50 ml.

Tabla 2.2. Concentraciones en  $\mu\text{g/g}$  de indol, escatol y 7-etilindol (IS) adicionadas en las muestras de grasa dorsal y ng inyectados. Análisis mediante HPLC-FN

Código	$\mu\text{g/g}$ adicionados			ng inyectados		
	7-etilindol	Escatol	Indol	7-etilindol	Escatol	Indol
P1	0,50	0,05	0,05	2,50	0,25	0,25
P2	0,50	0,10	0,10	2,50	0,50	0,50
P3	0,50	0,20	0,20	2,50	1,00	1,00
P4	0,50	0,30	0,30	2,50	1,50	1,50
P5	0,50	0,40	0,40	2,50	2,00	2,00
P6	0,50	0,50	0,50	2,50	2,50	2,50

Tabla 2.3. Concentraciones en  $\mu\text{g/g}$  de indol, escatol y 7-etilindol (IS) adicionadas en las muestras de músculo *longissimus dorsi* y ng inyectados. Análisis mediante HPLC-FN

Código	$\mu\text{g/g}$ adicionados			ng inyectados		
	7-etilindol	Escatol	Indol	7-etilindol	Escatol	Indol
P1	0,30	0,05	0,05	15,0	2,50	2,50
P2	0,30	0,10	0,10	15,0	5,0	5,0
P3	0,30	0,20	0,20	15,0	10,0	10,0
P4	0,30	0,30	0,30	15,0	15,0	15,0
P5	0,30	0,40	0,40	15,0	20,0	20,0

La linealidad y repetibilidad del método desarrollado se evaluaron en muestras de grasa de cerdo control a las que se adicionaron cantidades conocidas de androstenona, androstenoles y sus respectivos patrones internos, según se muestra en la Tabla 2.4. Todas las muestras se analizaron por duplicado. Previamente, se comprobó que las muestras de grasa no presentaban cantidades detectables de androstenona y androstenoles. Las muestras de grasa fortificadas permitieron determinar el factor respuesta de estos compuestos respecto a sus patrones internos.

#### 2.3.2.2. Purificación de los extractos grasos

La purificación de los extractos se realizó mediante cromatografía en fase sólida con columnas de octadecilsilica (Baker-Bond SPE C<sub>18</sub> 600 mg 6 ml 40 µm APD, 60 Å). Una alícuota de 5 ml de los extractos preparados (100 mg de grasa) se evaporó en un rotavapor. El extracto seco se redisolvió en 2 ml de metanol y se mantuvo aproximadamente durante 30 minutos a 20°C para favorecer la precipitación de la grasa. Posteriormente, los extractos metanólicos se decantaron sobre las columnas de C<sub>18</sub> previamente condicionadas con 10 ml de metanol y se adicionaron otros 2 ml de metanol. Las fracciones metanólicas se recogieron y evaporaron a sequedad en un rotavapor. El extracto se disolvió en 20 µl de iso-octano.

#### 2.3.2.3. Condiciones cromatográficas

El análisis se efectuó del siguiente modo:

- Cromatógrafo de gases: HP-5890 acoplado a un espectrómetro de masas HP-5970
- Gas portador: He a 0,8 ml/min
- Columna: HP-5MS (30 m x 250 µm; 0,25 µm)
- Programa de temperatura: 70°C(1min) - 10°C/min - 190°C - 5°C/min- 270°C(5 min)
- Inyección en modo *Splitless* (1 min.)
- Temperatura del inyector: 270°C
- Temperatura de la interfase: 280°C



- Detección en modo *SIM*. Los iones seleccionados fueron  $m/z$  (272, 257) para la androstenona,  $m/z$  (274, 202) para la  $5\alpha$ -androstan-3-ona,  $m/z$  (241, 274) para los androstenoles y  $m/z$  (243, 258) para el  $5\alpha$ -androstan- $3\alpha$ -ol
- Toma de datos: ordenador Hewlett Packard Vectra multimedia VL2 4/66

### 2.3.3. Determinación conjunta de los compuestos relacionados con el olor sexual en grasa dorsal de cerdo entero

La disponibilidad de un método analítico que facilite el análisis global de las sustancias relacionadas con el olor sexual en grasa de cerdo permitiría evaluar la contribución de cada compuesto al defecto sensorial. El indol, escatol, la androstenona y los androstenoles se separaron en fracciones de distinta polaridad mediante cromatografía de fase sólida en columnas de sílica. Además, también se determinó la presencia de otros compuestos que podrían contribuir al desarrollo del olor sexual.

#### 2.3.3.1. Preparación de las muestras

La extracción simultánea de las sustancias relacionadas con el olor sexual se realizó según el método descrito por Folch y col. (1957). 5  $\mu$ g de  $5\alpha$ -androstan-3-ona y  $5\alpha$ -androstan- $3\alpha$ -ol, patrones internos de la androstenona y de los androstenoles, se adicionaron a  $5\pm 0,01$  gramos de grasa disueltos en cloroformo. Los extractos se homogeneizaron en 200 ml de cloroformo:metanol (2:1) con un Ultraturrax (13000 g x 60 seg.). La solución se decantó y el proceso de extracción se repitió dos veces. Los extractos obtenidos se reunieron, filtraron sobre sulfato sódico anhidro y se llevaron hasta sequedad mediante un rotavapor. El residuo de grasa obtenido se disolvió en 100 ml de cloroformo y se mantuvo a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis.

Tabla 2.4. Concentraciones en  $\mu\text{g/g}$  de androstenona, androstenoles y patrones internos adicionados en muestras de grasa dorsal de cerdo y ng inyectados. Análisis mediante GC-MS.

Código	$\mu\text{g/g}$ Adicionados					ng Inyectados				
	5 $\alpha$ -An(IS)	IS-oles	5 $\alpha$ -An	5 $\alpha$ -An3 $\alpha$ ol	5 $\alpha$ -An3 $\beta$ ol	5 $\alpha$ -An(IS)	IS-oles	5 $\alpha$ -An	5 $\alpha$ -An3 $\alpha$ ol	5 $\alpha$ -An3 $\beta$ ol
P1	2,0	2,0	0,5	0,5	0,5	10,0	10,0	2,5	2,5	2,5
P2	2,0	2,0	1,0	1,0	1,0	10,0	10,0	5,0	5,0	5,0
P3	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0
P4	2,0	2,0	4,0	4,0	4,0	10,0	10,0	20,0	20,0	20,0

5 $\alpha$ -An: 5 $\alpha$ -androst-16-en-3-ona; 5 $\alpha$ -An(IS): 5 $\alpha$ -androstan-3-ona; 5 $\alpha$ -An3 $\alpha$ ol: 5 $\alpha$ -androst-16-en-3 $\alpha$ -ol; 5 $\alpha$ -An3 $\beta$ ol: 5 $\alpha$ -androst-16-en-3 $\beta$ -ol;  
 IS-oles: 5 $\alpha$ -androstan-3 $\alpha$ -ol

### 2.3.3.2. Purificación de los extractos grasos con columnas de sílica

La purificación de los extractos de grasa obtenidos se efectuó en columnas de vidrio (30 x 2 cm) empaquetadas con 10 gramos de sílica gel previamente desactivada a 120°C durante la noche. Las columnas se rellenaron en hexano y se dispuso una capa inferior y superior de aproximadamente 0,5 cm de sulfato sódico anhidro.

La alícuota correspondiente a 2 gramos de grasa se disolvió en 2 ml de hexano:éter dietílico (9:1) y se aplicó a la columna. Seguidamente, se eluyeron las fracciones siguientes:

- 1ª Fracción, 40 ml de hexano
- 2ª Fracción, 50 ml de hexano:éter dietílico (9:1)
- 3ª Fracción, 50 ml de hexano:éter dietílico (8:2)
- 4ª Fracción, 50 ml de hexano:éter dietílico (5:5)
- 5ª Fracción, 50 ml de éter dietílico
- 6ª Fracción, 50 ml de cloroformo:metanol (2:1)

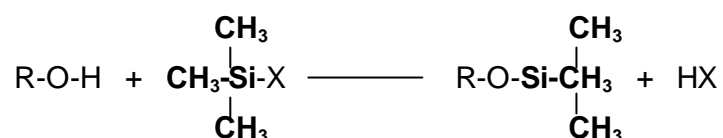
El extracto seco correspondiente a la segunda fracción de la columna de sílica se aplicó a una columna aminopropilsilica de 500 mg (Varian, USA) disuelto en 1 ml de éter dietílico:diclorometano:hexano (1:10:89). La columna se lavó previamente con 20 ml de una solución de éter dietílico:diclorometano:hexano (1:10:89). El esquema de elución fue el siguiente:

- 1ª Fracción, 10 ml de éter dietílico:diclorometano:hexano (1:10:89)
- 2ª Fracción, 15 ml de cloroformo:metanol (2:1)
- 3ª Fracción, 10 ml de éter dietílico:ácido acético (98:2)

La primera fracción se evaporó a sequedad y se redisolvió en hexano:2-propanol (92:8) para analizarse por HPLC-FN con detección por fluorescencia. Las fracciones se filtraron (filtros de PTFE de 13 mm de diámetro y 0,45 µm de poro) antes de inyectarlas en el cromatógrafo. La segunda fracción se concentró en iso-octano y se analizó por GC-MS.

### 2.3.3.2.1. Derivatización de los androstenoles

Los extractos secos correspondientes a la tercera y cuarta fracción de la columna de sílica se derivatizaron mediante Sylon (HMDS:TMCS:Piridina, 3:1:9) para obtener los derivados trimetilsilil de los androstenoles.



Los extractos secos de las fracciones estudiadas se disolvieron en 200 µl de Sylon-HTP. La mezcla se calentó a 80°C durante una hora y se dejó enfriar (Knapp, 1979). Seguidamente, la solución se evaporó bajo una corriente de nitrógeno y el residuo se redisolvió en 100 µl de iso-octano para ser analizado mediante GC-MS.

### 2.3.3.2.2. Condiciones cromatográficas

#### 2.3.3.2.2.1. Análisis de indol y escatol mediante HPLC-FN

El análisis cromatográfico se efectuó del siguiente modo:

- Cromatógrafo líquido LKB que consta de:
  - Bombas de alta presión LKB 2150 (0-350 bar)
  - Inyector Rheodyne 7215 con *loop* de 100 µl
  - Fluorímetro (Kontron)
- Columna: Hypersil APS-2 (250 mm x 4,6 mm, espesor de film 5 µm)
- Fase móvil: hexano:2-propanol (92:8)
- Flujo: 1,5 ml/min
- Detección por fluorescencia:  $\lambda_{\text{excitación}}$  a 280 nm y  $\lambda_{\text{emisión}}$  a 360 nm
- Toma de datos: Integrador *Spectra Physics Chromjet*

#### 2.3.3.2.2. Análisis de androstenona y androstenoles mediante GC-MS

El análisis cromatográfico se efectuó del siguiente modo:

- Cromatógrafo de gases HP-5890 acoplado a un detector selectivo de masas HP-5970
- Columna: DB-5 (30 m x 250  $\mu\text{m}$ , 0,25  $\mu\text{m}$ )
- Programa de temperatura: 70°C(1min) - 10°C/min - 200°C - 4°C/min - 270°C(5min)
- Temperatura inyector: 270°C
- Temperatura interfase: 280°C
- Inyección en modo *splitless* (1 min)
- Detección en modo *SCAN* (40-400 Da/e)
- Gas portador: He (30 cm/s)
- Toma de datos: ordenador Hewlett Packard Vectra multimedia VL2 4/66

#### 2.3.3.3. Purificación de los extractos grasos mediante cromatografía de filtración de gel

Una alícuota de 1 gramo del extracto graso obtenido, según se describe en el apartado 2.2.3.1. se evaporó a sequedad y se disolvió en diclorometano. El extracto obtenido se aplicó a una columna de filtración de gel (*Jordi Associated*, 680 mm x 25 mm de diámetro interno). La fase móvil utilizada fue diclorometano a un flujo de 5 cm<sup>3</sup>/min. Las fracciones obtenidas fueron:

1<sup>a</sup> Fracción: minuto 0-minuto 20

2<sup>a</sup> Fracción: minuto 20-minuto 45

3<sup>a</sup> Fracción: minuto 45-minuto 60

La segunda fracción se evaporó a sequedad y se saponificó a temperatura ambiente con KOH/MeOH 3N durante la noche. La fracción insaponificable se recuperó en 3 x 2 ml de diclorometano, se evaporó a sequedad y se redisolvió en iso-octano. El análisis cromatográfico se efectuó mediante GC-MS.

#### 2.3.3.3.1. Condiciones cromatográficas

El análisis cromatográfico se efectuó del siguiente modo:

- Cromatógrafo de gases HP-5890 acoplado a un detector selectivo de masas HP-5970
- Columna: HP-5 (25 m x 250 mm, 0,25 µm)
- Programa de temperatura: 70°C(1 min) - 10°C/min - 200°C - 7°C/min- 270°C(10min)
- Temperatura inyector: 270°C
- Temperatura interfase: 280°C
- Inyección en modo *splitless* (1 min)
- Detección en modo *SCAN* (40-400 Da/e)
- Gas portador: He (30 cm/s)
- Toma de datos: ordenador Hewlett Packard Vectra multimedia VL2 4/66

#### 2.3.4. Determinación de la 4-fenil-3-buten-2-ona en muestras de grasa dorsal de cerdo entero

La segunda fracción obtenida mediante la purificación de los extractos grasos por cromatografía de filtración de gel, según se describe en el apartado 2.2.3.3. se analizó por HPLC-FR y detección ultravioleta. Las condiciones cromatográficas fueron:

- Cromatógrafo líquido Waters que consta de:
  - Bomba 600 de baja presión
  - Inyector U6K con *loop* de 100 µl
  - Detector diodo array 990 (190-600 nm)
- Columna: RP-18 (150 mm x 4 mm, espesor de film 5 µm)
- Fase móvil: metanol:agua (80:20)
- Flujo: 1,5 ml/min

### 2.3.5. Determinación del porcentaje total de ácidos grasos en grasa dorsal de cerdo

#### 2.3.5.1. Extracción de los compuestos

La extracción de los lípidos se efectuó según el método descrito por Folch y col. (1957).  $1 \pm 0,01$  gramos de grasa se extrajeron en 100 ml de cloroformo:metanol (2:1) durante la noche. Los extractos se filtraron sobre sulfato sódico anhidro y se llevaron a sequedad en un rotavapor. 1 ml de KOH 0,5 N en metanol para saponificar los lípidos y 1 ml de  $\text{BF}_3$  en metanol al 14% para la formación de los ésteres metílicos se adicionaron a una alícuota correspondiente a unos 100 mg de grasa extraída, aproximadamente. La reacción se efectuó a  $100^\circ\text{C}$  durante 1 hora. Una vez enfriada la mezcla obtenida, se añadieron 2 ml de agua saturada con sal al 10% y 2 ml de hexano para la extracción de los ésteres metílicos de los ácidos grasos.

#### 2.3.5.2. Condiciones cromatográficas

El análisis cromatográfico se efectuó del siguiente modo:

- Cromatógrafo de gases HP-5890 Series II acoplado a un detector de ionización de llama
- Gas portador: He 1 ml/min
- Columna: FSOT DB-23 (30 m x 250  $\mu\text{m}$ ; 0,25  $\mu\text{m}$ )
- Programa de temperatura:  $150^\circ\text{C}$  -  $4^\circ\text{C}/\text{min}$  -  $220^\circ\text{C}$  (5min)
- Temperatura del inyector:  $250^\circ\text{C}$
- Inyección en modo *split*
- Temperatura del detector:  $270^\circ\text{C}$
- Toma de datos: integrador HP3394

## 2.3.6. Análisis de volátiles

### 2.3.6.1. *Head Space* estático

#### 2.3.6.1.1. Preparación de las muestras

En un vial de 5 ml para *Head Space* se pesaron 0,5-1 gramos de grasa a los que se añadieron las cantidades de indol, escatol y androstenona necesarias para obtener una concentración final de 20 µg/g. El vial se selló y se colocó durante una hora en un horno a una temperatura de 120°C para que se estableciera el equilibrio entre la fase sólida y la fase vapor. Transcurrido este tiempo se recogió 1 ml de la fase vapor y se inyectó en el cromatógrafo de gases mediante una jeringa especial para la inyección manual de gases también calentada en el horno. La influencia de la matriz sobre la transferencia a la fase vapor de los compuestos estudiados se evaluó mediante el mismo procedimiento analítico, pero sin colocar grasa en el vial. 10 µg de indol, escatol y androstenona se dispensaron en un vial de *Head Space* estático disueltos en 5 ml de cloroformo. El cloroformo se evaporó bajo una corriente de nitrógeno y el vial se selló y colocó en un horno en las mismas condiciones descritas anteriormente.

#### 2.3.6.1.2. Condiciones cromatográficas

El análisis cromatográfico se efectuó del siguiente modo:

- Cromatógrafo de gases Dani acoplado a un detector de ionización de llama
- Gas portador He a 1,0 bar (28 cm/seg)
- Columna: FSOT DB-5 (15 m x 250 µm; 0,25 µm)
- Programa de temperatura: 80°C - 10°C/min - 280°C
- Temperatura del inyector: 270°C
- Inyección en modo *splitless* (45 segundos)
- Temperatura del detector: 280°C
- Gases detector FID: N<sub>2</sub> a 40 ml/min  
H<sub>2</sub> a 50 ml/min  
Aire a 50 ml/min



- Toma de datos: ordenador NEC APC III

### 2.3.6.2. *Head Space* dinámico

#### 2.3.6.2.1. Preparación de las muestras

Para el análisis de volátiles mediante técnicas de *Head Space* dinámico se pesaron  $1 \pm 0,01$  gramos de grasa previamente picada en un tubo con tapón esmerilado (15 mm x 2,5 mm), al que se acopló un tapón con dos orificios, uno para la entrada de helio y otro para la salida. El tubo se colocó en un bloque de temperatura a 120°C y se aplicó una corriente de helio a un flujo de 50 ml/min a través del orificio de entrada durante 1 hora. Los compuestos volátiles se recogieron a través del orificio de salida mediante un cartucho de grafito de 10 x 0,5 cm (Retorik, Suiza). Se adicionaron 2 µg de tolueno deuterado (patrón interno) para la cuantificación de los compuestos identificados.

#### 2.3.6.2.2. Condiciones cromatográficas

Los compuestos volátiles recogidos fueron deadsorbidos del cartucho mediante energía de microondas (Retorik, Suiza) a una temperatura de 600°C durante nueve segundos y analizados por GC-MS.

- Sistema GC-MS: cromatógrafo de gases HP-5890 acoplado a un espectrómetro de masas HP-5970  
cromatógrafo de gases Fisons 8000 acoplado a un espectrómetro de masas (cuádruplo Trio 2000)
- Gas portador: He a 1 bar (28 cm/seg)
- Inyección en modo *splitless* (1min)
- Columna: FSOT DB-5 (50 m x 200 µm; 0,33 µm)
- Programa de temperatura: 50°C (1min) - 5°C/min -270°C (5min)
- Temperatura de la interfase: 180°C
- Detección en modo *SCAN* (40-400 Da/e)
- Toma de datos: ordenador Hewlett Packard Vectra multimedia VL2 4/66 y ordenador Digital DECpc Lpv 466d2

### 2.3.7. Evaluación sensorial

Los compuestos identificados en las muestras de grasa dorsal clasificadas con olor sexual y concentraciones bajas de escatol y androstenona mediante las diferentes metodologías desarrolladas se evaluaron sensorialmente por personas sensibles a la androstenona. Diferentes concentraciones de estas sustancias se adicionaron a  $5 \pm 0,01$  gramos de grasa control que se pesaron en botellas de 250 ml con tapón de rosca. Paralelamente, se fortificaron muestras de grasa con distintas concentraciones de androstenona y escatol, junto con los compuestos identificados. Posteriormente, los recipientes se dispusieron en un baño de agua a  $60^{\circ}\text{C}$  durante 1 hora, se dejaron enfriar y se presentaron a los miembros del panel seleccionados. Previamente, se comprobó que las muestras de grasa utilizadas no contenían cantidades de androstenona y/o escatol perceptibles sensorialmente.

### 2.3.8. Modelo estadístico

#### 2.3.8.1. Análisis de la varianza

Las diferencias significativas entre la concentración media de indol, escatol, androstenona y androstenoles en las muestras de grasa dorsal de cerdos enteros analizadas se determinaron mediante el procedimiento “*General Linear Models*” (GLM) con análisis de covarianza del paquete estadístico SAS (SAS, 1988). Las variables definidas en el modelo estadístico fueron la clase (presencia o no de olor sexual según los resultados del panel sensorial), el país de origen de las canales y el grupo (categoría de concentración de androstenona y escatol determinada mediante ELISA o mediante el método colorimétrico). También se consideraron los efectos de las interacciones entre la clase y el país y la clase y el grupo. Como covariables se incluyeron el peso de la canal y el porcentaje de magro. El modelo estadístico aplicado fue:

$$Y_{ijkl} = \mu + \text{clase}_i + \text{país}_j + \text{grupo}_k + (\text{clase} \times \text{país})_{ij} + (\text{clase} \times \text{grupo})_{ik} + b_1 \text{canal}_{ijkl} + b_2 \text{magro}_{ijkl} + e_{ijkl}$$

Las variables y covariables que no fueron significativas se eliminaron posteriormente del modelo estadístico.

#### 2.3.8.2. Análisis de correlación

El procedimiento CORR del paquete estadístico SAS (SAS, 1988) se aplicó para evaluar las correlaciones entre los métodos analíticos desarrollados durante el presente trabajo de Tesis y los métodos aplicados por el resto de países europeos participantes. También se evaluó la correlación entre las concentraciones de los diferentes compuestos determinados en muestras de grasa, dorsal y de recubrimiento, y en muestras de músculo *longissimus dorsi*.

#### 2.3.8.3. Análisis de componentes principales

Un análisis de componentes principales (PCA) del paquete estadístico SAS (SAS, 1988) se aplicó para representar gráficamente las relaciones entre los diferentes métodos analíticos de determinación de la androstenona y del escatol. Este análisis también se aplicó en el análisis de volátiles y en la cromatografía de filtración de gel para determinar los compuestos que se relacionaban con la presencia de olor sexual en las muestras de grasa analizadas.

## **CAPITULO III**

*Resultados*

### 3.1. Metodologías analíticas

La metodología analítica desarrollada durante el presente trabajo de Tesis doctoral para la determinación de los compuestos relacionados con la presencia de olor sexual en muestras de grasa de cerdo ha presentado, básicamente, dos enfoques:

- Desarrollo de métodos rápidos que facilitan un tratamiento mínimo de las muestras y, por tanto, una determinación rápida y sencilla del indol, escatol, androstenona y androstenoles. Estos procedimientos analíticos permiten procesar un número importante de muestras en un intervalo de tiempo corto y, además, evaluar el efecto de diversos tratamientos y efectos en el laboratorio como la castración, la alimentación, la selección genética, el peso de sacrificio de la canal, el porcentaje de magro y la estación del año.
- Desarrollo de métodos de análisis más laboriosos que permitan separar los diferentes compuestos presentes en la grasa según sus propiedades físico-químicas y evaluar su contribución al olor sexual o a otros defectos sensoriales que puedan mostrarse en la carne y provocar el rechazo de los consumidores.

La validación de los diferentes procedimientos analíticos diseñados en este trabajo se realizó en presencia de los posibles compuestos interferentes de la matriz para minimizar su influencia en la detección y cuantificación de los compuestos de interés. La repetibilidad y linealidad de los métodos desarrollados se evaluaron en el intervalo de concentraciones a estudiar. La mayor dificultad que entrañó el desarrollo de las metodologías diseñadas fue la separación entre los compuestos relacionados con el olor sexual y la matriz lipídica. La naturaleza lipofílica del escatol y de la androstenona obligó a optimizar las condiciones de extracción y purificación de los extractos grasos para eliminar las interferencias ocasionadas por los triglicéridos y ácidos grasos, que dificultan el análisis cromatográfico posterior. La elección de los métodos de separación y sistemas de detección cromatográficos se efectuó de forma que facilitaran una elevada sensibilidad y resolución y los patrones internos se seleccionaron para asegurar una correcta cuantificación de los compuestos.

### 3.1.1. Determinación de indol y escatol en muestras de grasa dorsal de cerdo entero mediante cromatografía líquida en fase normal (Rius, 1997, García-Regueiro y Rius, 1998)

La mayor innovación de la metodología analítica desarrollada es la ausencia de procedimientos de purificación de los extractos de tejido adiposo. El buen rendimiento observado en la extracción del indol y del escatol mediante una solución de hexano:2-propanol (92:8), junto a la selectividad de la detección fluorimétrica, permitió el análisis cromatográfico directo de los extractos grasos resultantes, evitándose la realización de procesos de purificación y evaporación. Previamente, se comprobó la ausencia de interferencias fluorimétricas ocasionadas por la solución extractora utilizada. La optimización de la cantidad de grasa inicial permitió reducir el uso de disolventes y el tiempo de extracción de los compuestos a 30 minutos.

El análisis cromatográfico de los extractos de grasa se realizó mediante cromatografía líquida en fase normal, que ofreció una eliminación y separación efectiva de las sustancias de características más hidrofóbicas extraídas junto a los compuestos indólicos estudiados. De esta forma, los triglicéridos no se retuvieron en la columna, como sucede mediante la utilización de la fase reversa, y se eluyeron a tiempos de retención inferiores a los observados para el indol y escatol (Rius, 1997).

Diferentes fases móviles se evaluaron durante el desarrollo del método analítico para optimizar la resolución cromatográfica y el tiempo de análisis. El hexano es uno de los disolventes más utilizados como fase móvil cuando se trabaja en fase normal. No obstante, la elución en hexano de los compuestos estudiados se produjo a tiempos de retención elevados y los picos obtenidos presentaron una simetría deficiente. La adición de 2-propanol a la composición de la fase móvil aumentó la resolución de la separación y disminuyó los valores de los factores de retención o capacidad ( $k$ ). Los cromatogramas de soluciones patrón de indol, escatol y 7-etilindol (patrón interno) obtenidos, según la proporción de 2-propanol de la fase móvil, se presentan en la Figura 3.1. El escatol y el patrón interno se eluyeron como un pico único cuando la proporción de 2-propanol fue superior al 10%, debido a una excesiva polaridad de la fase móvil. Una

resolución adecuada entre los picos de interés se obtuvo cuando la proporción de hexano:2-propanol fue de (92:8). Los cromatogramas de HPLC-FN y detección por fluorescencia de una solución patrón de indol, escatol y 7-etilindol y de un extracto de grasa dorsal de cerdo con 500 ng de patrón interno se muestran en la Figura 3.2 y Figura 3.3, respectivamente. La utilización de una columna Hypersil con una fase estacionaria aminopropilsilica de 250 x 4,6 mm y un tamaño de partícula de 5  $\mu\text{m}$  permitió el análisis cromatográfico del indol y escatol en muestras de grasa en un tiempo de 5 minutos.

La utilización de una columna cromatográfica con una fase estacionaria de las mismas características, pero unas dimensiones (100 x 4,6 mm) y un tamaño de partícula menores (3  $\mu\text{m}$ ) permitió reducir el tiempo de análisis a 3 minutos. No obstante, después de analizar un número moderado de muestras disminuyó la estabilidad de la columna y la resolución cromatográfica entre picos. Los cromatogramas obtenidos en estas condiciones cromatográficas correspondientes a una solución patrón de indol, escatol y 7-etilindol y a un extracto de grasa dorsal de cerdo fortificada con 500 ng de patrón interno se presentan en la Figura 3.4 y Figura 3.5, respectivamente.

Los compuestos indólicos estudiados pueden detectarse por espectrometría ultravioleta o por fluorescencia. Los detectores de fluorescencia ofrecen una sensibilidad y selectividad mayor. Los espectros de absorción en el ultravioleta (240-330 nm) del escatol, indol y 7-etilindol en hexano:2-propanol (92:8) se presentan en la Figura 3.6. Todos los compuestos estudiados presentaron un máximo relativo de absorción a 280 nm, que fue la longitud de onda seleccionada para efectuar la detección en ultravioleta. Sin embargo, la detección en ultravioleta resultó inadecuada en el desarrollo del método analítico a consecuencia de la menor sensibilidad que presentó respecto a la fluorescencia. El estudio del espectro de emisión del indol, escatol y 7-etilindol a una longitud de onda de excitación de 280 nm señaló que los tres compuestos considerados presentaban un máximo de emisión a 360 nm, longitud de onda seleccionada para la emisión.

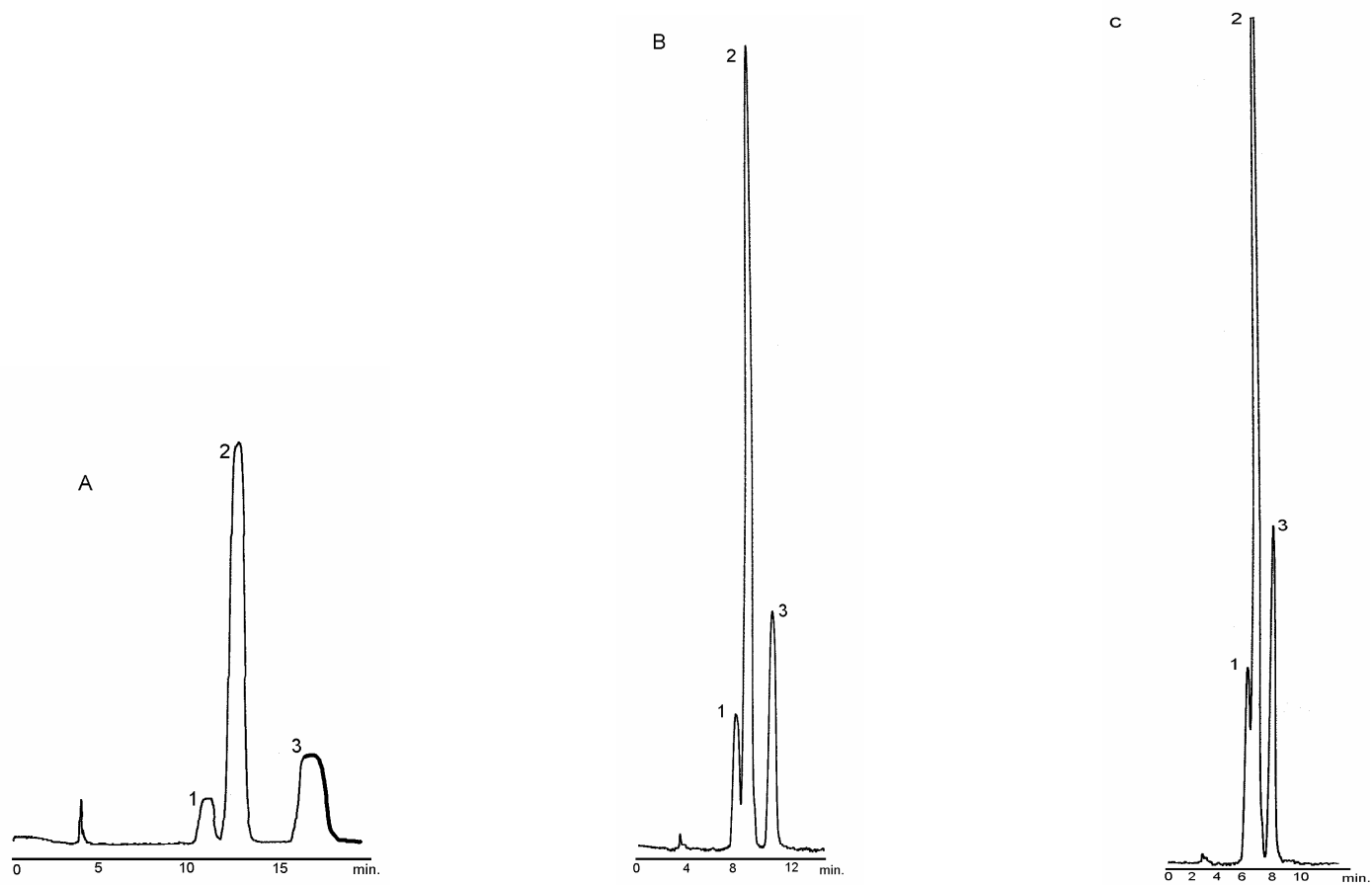


Figura 3.1. Separación cromatográfica de una solución patrón de indol, escatol y 7-etilindol según la composición de la fase móvil utilizada. (A) Hexano:2-propanol (98:2); (B) Hexano:2-propanol (94:6); (C) Hexano:2-propanol (90:10). Identificación de los picos: (1) 7-etilindol; (2) escatol; (3) indol. Análisis por HPLC-FN y detección por fluorescencia ( $\lambda_{exc}=280$  nm y  $\lambda_{em}=360$  nm)



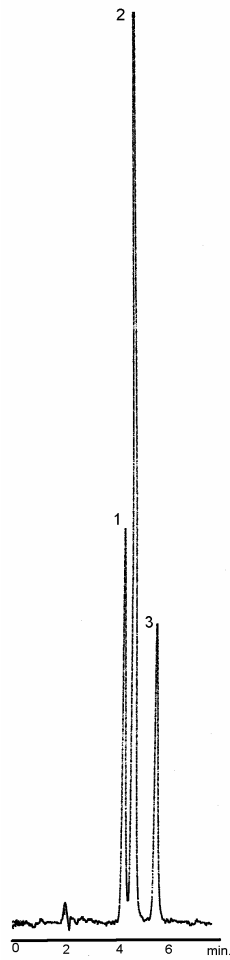


Figura 3.2. Cromatograma de HPLC-FN y detección por fluorescencia ( $\lambda_{exc}=280$  nm y  $\lambda_{em}=360$  nm) de una solución patrón de: (1) 7-etilindol, (2) escatol, (3) indol. Columna: *Hypersil APS-2* (250 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m)

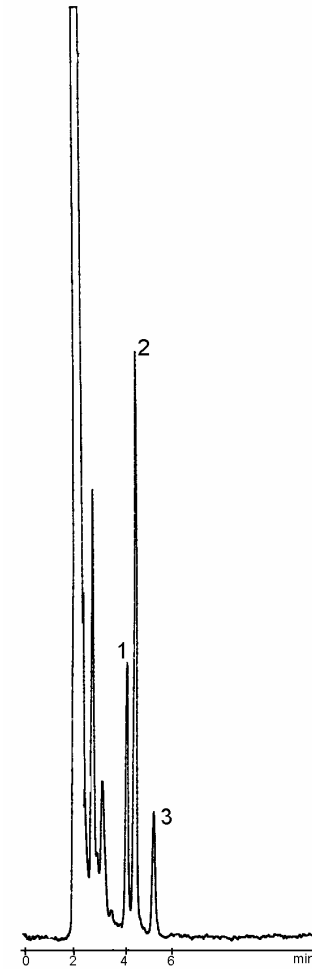


Figura 3.3. Cromatograma de HPLC-FN y detección por fluorescencia ( $\lambda_{exc}=280$  nm y  $\lambda_{em}=360$  nm) de un extracto de grasa dorsal de cerdo entero. Columna: *Hypersil APS-2* (250 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m). Picos: (1) 7-etilindol, (2) escatol, (3) indol

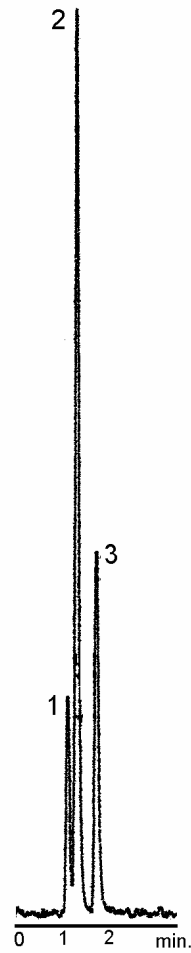


Figura 3.4. Cromatograma de HPLC-FN y detección por fluorescencia ( $\lambda_{exc}=280$  nm y  $\lambda_{em}=360$  nm) de una solución patrón de: (1) 7-etilindol, (2) escatol y (3) indol. Columna: *Hypersil APS-2* (100 x 4,6 mm, 3 $\mu$ m)

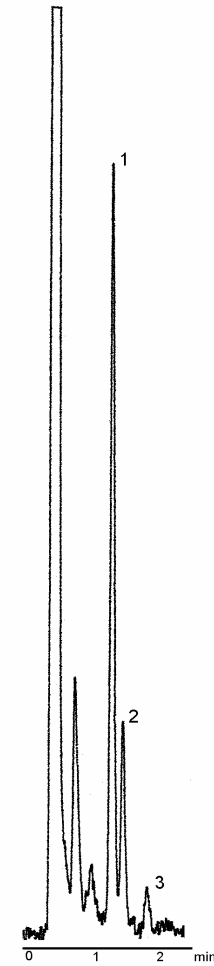


Figura 3.5. Cromatograma de HPLC-FN y detección por fluorescencia ( $\lambda_{exc}=280$  nm y  $\lambda_{em}=360$  nm) de un extracto de grasa dorsal de cerdo entero. Columna: *Hypersil APS-2* (100 x 4,6 mm, 3 $\mu$ m). Picos: (1) 7-etilindol, (2) escatol y (3) indol

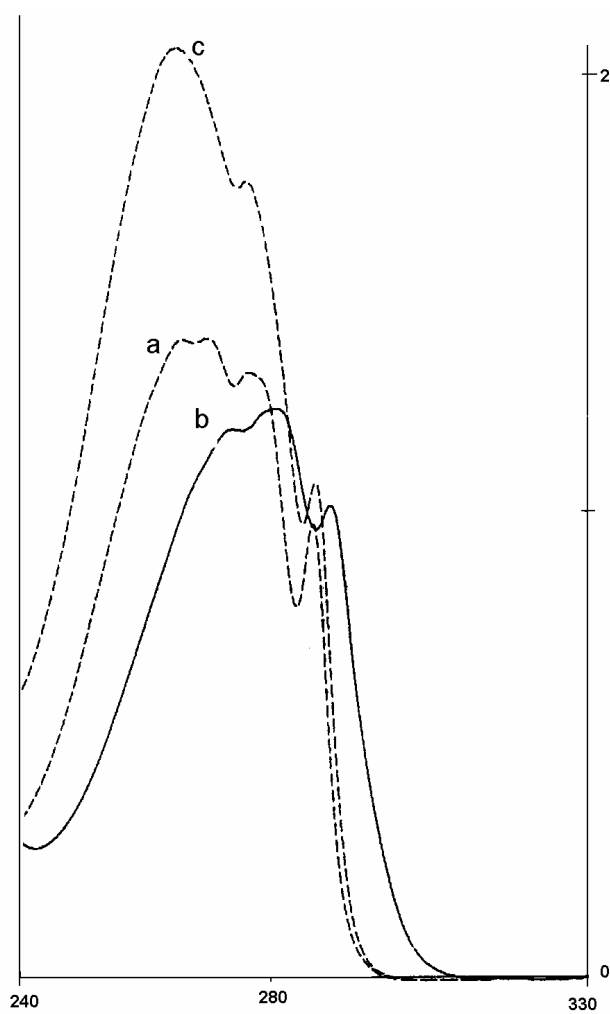


Figura 3.6. Espectro de absorción en el ultravioleta (240-330nm) del (a) indol, (b) escatol y (C) 7-etilindol en una solución de hexano:2-propanol (92:8)

Las respuestas relativas del escatol e indol respecto al patrón interno utilizado, el 7-etilindol, son de gran importancia para el aspecto cuantitativo del método desarrollado. Cantidades crecientes de escatol e indol se inyectaron frente a una cantidad constante de patrón interno para determinar el factor de respuesta. Los resultados obtenidos mostraron que el 7-etilindol es un patrón interno adecuado, porque presenta una relación lineal con el indol ( $y=2,204 x - 0,0603$ ,  $R^2=0,9911$ ) y escatol ( $y=5,996 x - 0,061$ ,  $R^2=0,9984$ ). Los valores de las respuestas relativas obtenidas fueron de (5,996) para escatol/7-etilindol y de (2,204) para indol/7-etilindol. Según estos resultados, el patrón interno seleccionado para la cuantificación del indol y escatol presentó, en las longitudes de onda seleccionadas, una menor respuesta en comparación al indol y escatol. La utilización como patrones internos de otros compuestos indólicos de mayor fluorescencia, tales como el 2-metilindol o el 5-metilindol, no fue factible, porque en las condiciones cromatográficas empleadas se eluían junto con el escatol.

La linealidad y repetibilidad del método analítico desarrollado se evaluaron en muestras de grasa dorsal que se habían analizado previamente para comprobar la ausencia de concentraciones detectables o mínimas ( $<0,01 \mu\text{g/g}$ ) de indol y escatol. La linealidad de la metodología se estudió en el margen de concentraciones de  $0,05-1,0 \mu\text{g/g}$  y las rectas de regresión obtenidas fueron:  $y=63,44 x - 0,06$  ( $R^2=0,9914$ ) para el indol y  $y=157,19 x + 2,82$  ( $R^2=0,9916$ ) para el escatol. De acuerdo con estos resultados, la determinación y cuantificación del escatol e indol es posible en el margen típico de concentraciones en que se encuentran estos compuestos en las muestras de grasa porcina.

La repetibilidad del método analítico desarrollado se evaluó en un total de 7 muestras de grasa fortificadas por duplicado con concentraciones conocidas de indol, escatol y 7-etilindol (Tabla 3.1). Los coeficientes de variación del área absoluta fueron 2,49%, 1,10% y 3,45% para el indol, escatol y 7-etilindol, respectivamente. El área relativa se considera la relación entre el área absoluta de cada pico respecto al área total y multiplicado por cien. Los valores de los coeficientes de variación de las áreas relativas fueron inferiores al 2% para el indol y escatol, aunque el 7-etilindol presentó un valor ligeramente superior (5,80%). Los valores de los coeficientes de variación de los tiempos de retención fueron inferiores al 0,5%. Los resultados obtenidos manifestaron la viabilidad del método desarrollado para determinar y cuantificar los compuestos indólicos estudiados.

El rendimiento del método analítico se evaluó en muestras de grasa dorsal de cerdo a las que se añadieron cantidades conocidas de indol y escatol hasta obtener una concentración final de 0,05-0,10-0,20-0,40-0,50  $\mu\text{g/g}$ . Los porcentajes medios de recuperación obtenidos para el indol y escatol, respecto al patrón interno, fueron  $99,57\% \pm 4,46$  y  $100,27\% \pm 0,87$ , respectivamente (Tabla 3.2).

La aplicabilidad del método analítico desarrollado se evaluó mediante la determinación de las concentraciones de escatol e indol en un total de 16 muestras de grasa dorsal procedentes de canales comerciales de cerdos enteros. Los resultados obtenidos en este estudio se presentan en la Tabla 3.3. La concentración de indol y escatol de las muestras analizadas presentó una gran variabilidad. Los valores de concentración máximos obtenidos fueron 1,04  $\mu\text{g/g}$  para el escatol y 0,68  $\mu\text{g/g}$  para el indol. En general, la concentración de escatol fue superior a la de indol en la mayoría de las muestras de grasa analizadas (11/16). Sin embargo, la concentración de indol fue ligeramente superior en algunas muestras (6, 7, 9 y 13).

La concentración de escatol fue superior a 0,22  $\mu\text{g/g}$ , límite a partir del cual se considera que las canales pueden ser rechazadas por los consumidores, en 7 de las 16 muestras de grasa analizadas, aunque un total de 8 muestras presentaron una concentración de escatol inferior a 0,10  $\mu\text{g/g}$ . Si consideramos la concentración suma de indol y escatol, 8 muestras de las 16 analizadas presentaron una concentración total superior a 0,22  $\mu\text{g/g}$  y sólo en 2 muestras se observó una concentración suma inferior a 0,10  $\mu\text{g/g}$ . La concentración suma de indol y escatol en las muestras de grasa restantes (6/16) se situó entre 0,10-0,21  $\mu\text{g/g}$ .

Según estos resultados, el indol modifica la clasificación de las muestras de grasa en los diferentes intervalos de concentraciones considerados, principalmente cuando el contenido de escatol es bajo. La aplicación de métodos de análisis que no permiten determinar de forma específica el indol y el escatol (métodos colorimétricos) puede conducir a la obtención de resultados erróneos en la cuantificación del escatol y, por tanto, en la evaluación de sus efectos en el olor sexual.

Tabla 3.1. Repetibilidad del método analítico desarrollado en 7 muestras de grasa dorsal de cerdo fortificadas con 0,10 µg/g de indol, escatol y 7-etilindol. Análisis mediante HPLC-FN.

	t <sub>R</sub>			Área Absoluta			Área Relativa		
	X	DE	CV	X	DE	CV	X	DE	CV
Indol	5,11	0,02	0,39	29004,62	721,97	2,49	11,20	0,21	1,87
Escatol	4,36	0,02	0,46	181558,62	2004,14	1,10	69,71	1,03	1,48
7-etilindol	4,00	0,02	0,50	47934,44	1655,07	3,45	19,12	1,11	5,80

X: media aritmética; DE: desviación estándar; CV: coeficiente de variación  
t<sub>R</sub>: tiempo de retención

Tabla 3.2. Rendimiento de extracción (%) obtenido para el escatol e indol mediante el método desarrollado en un total de 10 muestras de grasa. Análisis por HPLC-FN.

	Concentraciones (µg/g)	Recuperación (%)
Indol	0,05	102,56
	0,10	92,42
	0,20	98,25
	0,40	103,47
	0,50	101,15
X		99,57
DE		4,46
CV (%)		4,48
Escatol	0,05	101,12
	0,10	100,14
	0,20	101,21
	0,40	99,27
	0,50	99,63
X		100,27
DE		0,87
CV (%)		0,87

X: media aritmética; DE: desviación estándar; CV: coeficiente de variación

Tabla 3.3. Concentraciones de indol y escatol ( $\mu\text{g/g}$ ) determinadas en muestras comerciales de grasa dorsal de cerdo. Análisis mediante HPLC-FN.

Muestra	Indol	Escatol	Escatol+Indol	Escatol/Indol
1	0,02	0,03	0,05	1,81
2	0,06	0,08	0,14	1,45
3	0,04	0,07	0,12	1,70
4	0,03	0,05	0,08	1,48
5	<b>0,59</b>	<b>0,58</b>	1,17	0,99
6	0,09	0,04	0,13	0,46
7	0,08	0,05	0,13	0,64
8	0,07	<b>0,39</b>	0,46	5,71
9	<b>0,38</b>	<b>0,15</b>	0,53	0,40
10	0,03	0,08	0,12	2,51
11	0,04	0,08	0,12	1,70
12	0,10	<b>0,37</b>	0,47	3,51
13	<b>0,68</b>	<b>0,27</b>	0,95	0,40
14	<b>0,45</b>	<b>1,04</b>	1,50	2,29
15	0,07	<b>0,28</b>	0,35	3,77
16	0,07	<b>0,25</b>	0,32	3,49
X $\pm$ DE	0,16 $\pm$ 0,22	0,24 $\pm$ 0,27	0,41 $\pm$ 0,43	2,02 $\pm$ 1,48

X: media aritmética; DE: desviación estándar

3.1.2. Determinación de androstenona y androstenoles en grasa dorsal de cerdo mediante cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas (Rius y García-Regueiro, 1998; Rius y col., submitted)

La androstenona, junto con el escatol, es responsable de la presencia de olor sexual en las canales de cerdos enteros. La principal finalidad del método desarrollado durante el presente trabajo de Tesis fue la determinación de androstenona en muestras de grasa dorsal sin aplicar tratamientos excesivamente largos a las muestras para eliminar los triglicéridos y ácidos grasos. Paralelamente, los androstenoles se analizaron de forma simultánea, aunque su contribución al olor sexual no se ha determinado con exactitud (Bonneau, 1982).

El diclorometano se utilizó para la extracción de los compuestos del tejido adiposo. Este disolvente permitió una completa extracción de los compuestos estudiados y la solución obtenida pudo evaporarse en un rotavapor. Además, los extractos fueron estables en el congelador a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante un tiempo aproximado de seis meses.

La eliminación de los compuestos mayoritarios de la grasa mediante precipitación en metanol a temperaturas de congelación se ha descrito en diversos estudios (García-Regueiro y Díaz, 1989; Hansen-Møller, 1992, 1994; Tuomola y col., 1996). El aspecto más crítico de este procedimiento es la coprecipitación de los compuestos estudiados junto con la grasa, debido a que los extractos se mantienen a temperaturas de congelación durante un periodo de tiempo excesivo. Los extractos disueltos en metanol se dispusieron a temperatura ambiente hasta observarse la precipitación de los lípidos para minimizar la precipitación de los compuestos de interés. No obstante, la presencia de grasa en el extracto seco no permitió su análisis directo mediante cromatografía de gases una vez evaporado el metanol. El mantenimiento de los extractos metanólicos a temperaturas de refrigeración ( $4-5^{\circ}\text{C}$ ) para favorecer la precipitación de la grasa no mejoró significativamente los resultados. También se evaluó la solubilidad de la grasa en otros disolventes, como el acetonitrilo o la acetona, y se comprobó que la precipitación de la grasa disminuía significativamente en comparación a la observada en metanol.



La sensibilidad del sistema cromatográfico aplicado para la detección (GC-MS) de los compuestos permitió reducir considerablemente la cantidad de muestra inicial y simplificó el tratamiento posterior de las muestras. Por otra parte, la eliminación de gran parte de la grasa debido a la precipitación en metanol facilitó la purificación de los extractos mediante la utilización de columnas de extracción en fase reversa (C18). Este procedimiento permitió que los lípidos aún presentes en los extractos se retuvieran en la columna, mientras la androstenona y los androstenoles se eluían. Posteriormente, las columnas se lavaron con metanol para favorecer la recuperación de las moléculas retenidas junto a la grasa.

El análisis cromatográfico de la androstenona y de los androstenoles se efectuó por cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas. La determinación de la androstenona en muestras de grasa dorsal o en glándulas salivares se ha descrito ampliamente en la bibliografía (Bicknell y Gower, 1976; DeBrabander y Verbeke, 1986; Hansen-Møller, 1994), pero el número de trabajos que describen la determinación simultánea de los androstenoles en estos tejidos es limitado (García-Regueiro y Díaz, 1989). La utilización de columnas capilares de polaridad baja, como por ejemplo 5% fenilmetilsilicona, permitió el análisis de los androstenoles con una resolución, selectividad y estabilidad térmica suficiente, observándose una correcta separación cromatográfica entre los picos eluidos. Además, el análisis cromatográfico de estos compuestos sin la realización de reacciones previas de derivatización simplifica y favorece su determinación.

La detección de la androstenona y de los androstenoles puede realizarse mediante la utilización de detectores de ionización de llama si los extractos finales no presentan un elevado número de impurezas, aunque la sensibilidad es baja. Además, la baja selectividad y la ausencia de información sobre su estructura molecular no permite la identificación precisa de los picos obtenidos. La espectrometría de masas en modo SIM (Selected Ion Monitoring) permitió seleccionar los fragmentos de  $m/z$  característicos de cada compuesto estudiado. Los iones seleccionados aumentaron la selectividad del método y permitieron la identificación de todos los compuestos estudiados. Los fragmentos seleccionados para la cuantificación de los resultados del método fueron  $m/z$  (272) para la androstenona y  $m/z$  (274) para los androstenoles. Este último

fragmento se seleccionó para la cuantificación de los alcoholes, frente al fragmento  $m/z$  241 de mayor abundancia, porque generaba cromatogramas con un menor número de compuestos interferentes en la zona de cuantificación de interés. Los espectros de masas de la androstenona, de los androstenoles y de sus patrones internos y la abundancia relativa de los fragmentos obtenidos por impacto electrónico se presentan en la Figura 3.7 y en la Figura 3.8, respectivamente.

El cromatograma de ion total (TIC) de una solución patrón de androstenona, androstenoles ( $5\alpha$ -An- $3\alpha$ -ol,  $5\alpha$ -An- $3\beta$ -ol) y sus correspondientes patrones internos:  $5\alpha$ -androstan-3-ona y  $5\alpha$ -androstan- $3\alpha$ -ol se muestra en la Figura 3.9. El mismo cromatograma obtenido al seleccionar los fragmentos de  $m/z$  272, 274 y 243, que permiten detectar la presencia de estos compuestos, se presenta en la Figura 3.10. El cromatograma obtenido en modo SIM al analizar una muestra de grasa fortificada con 1  $\mu\text{g/g}$  de androstenona, androstenoles y los correspondientes patrones internos se presenta en la Figura 3.11. La eliminación del material lipídico mediante la precipitación en metanol y la purificación en fase sólida (C18) permitieron obtener cromatogramas libres de interferencias y facilitó la identificación y cuantificación de los compuestos a estudiar.

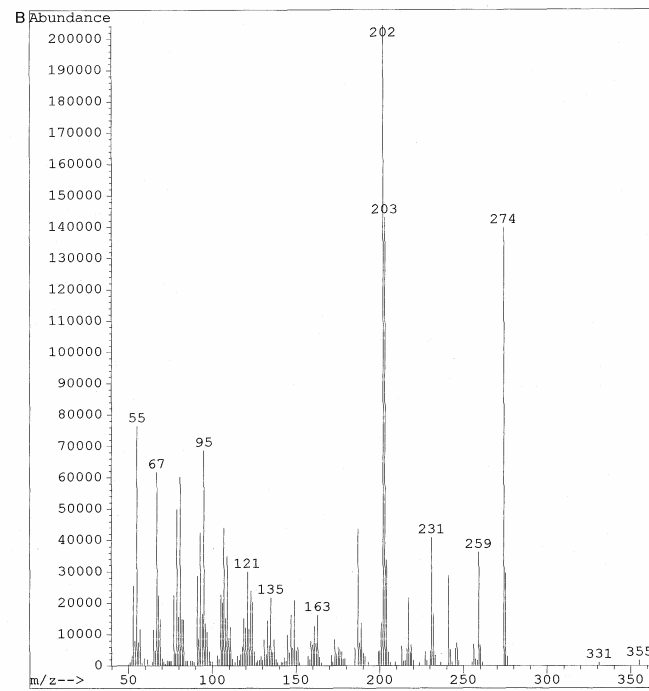
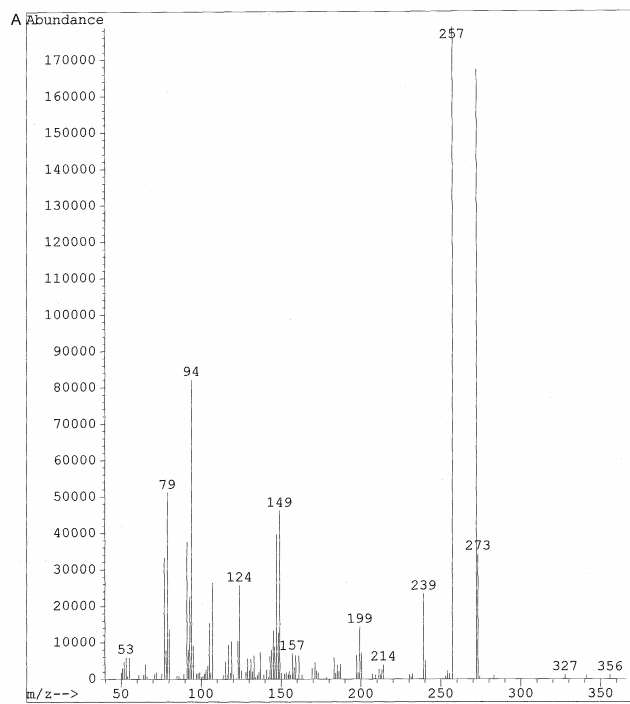


Figura 3.7. Espectros de masas de la 5 $\alpha$ -androst-16-en-3-ona (A) y de la 5 $\alpha$ -androstan-3-ona (B). Análisis mediante GC-MS

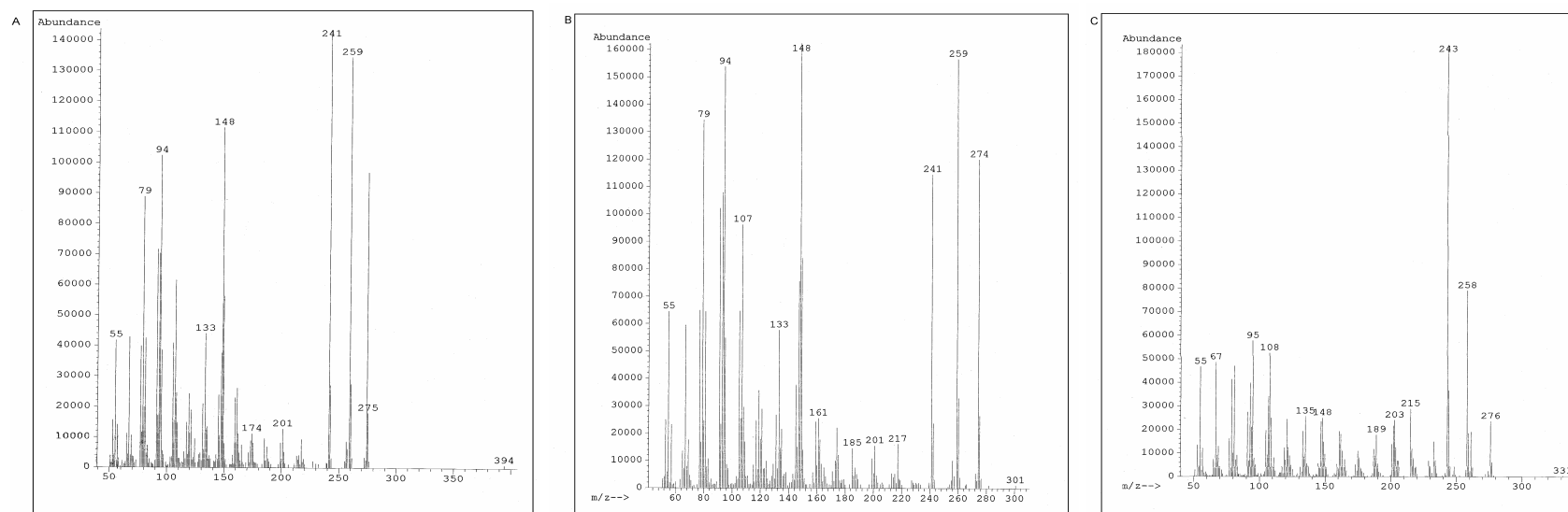


Figura 3.8. Espectros de masas del 5 $\alpha$ -androst-16-en-3 $\alpha$ -ol (A), 5 $\alpha$ -androst-16-en-3 $\beta$ -ol (B) y 5 $\alpha$ -androstan-3 $\alpha$ -ol (C). Análisis mediante GC-MS

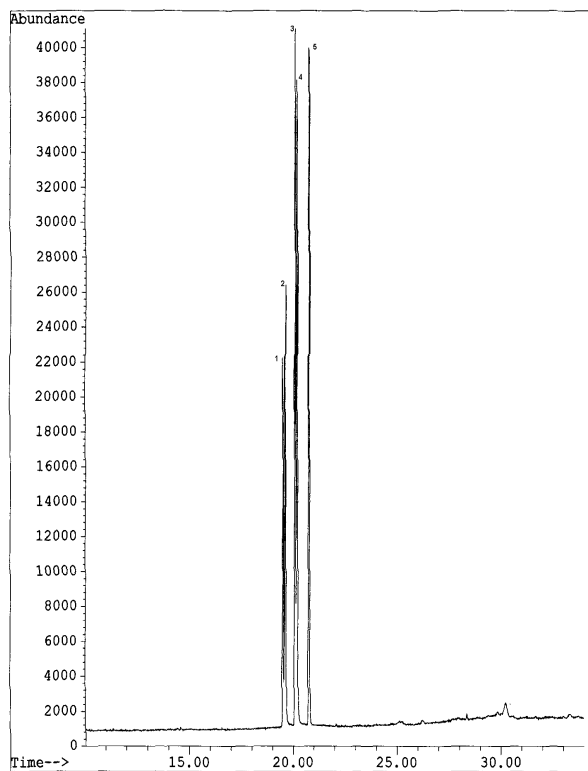


Figura 3.9. Cromatograma cGC-MS *TIC* de una solución patrón de 10 ng/μl. Picos: (1) 5α-An-3α-ol; (2) 5α-An-3β-ol; (3) 5α-An; (4) 5α-androstan-3α-ol; (5) 5α-androstan-3-ona

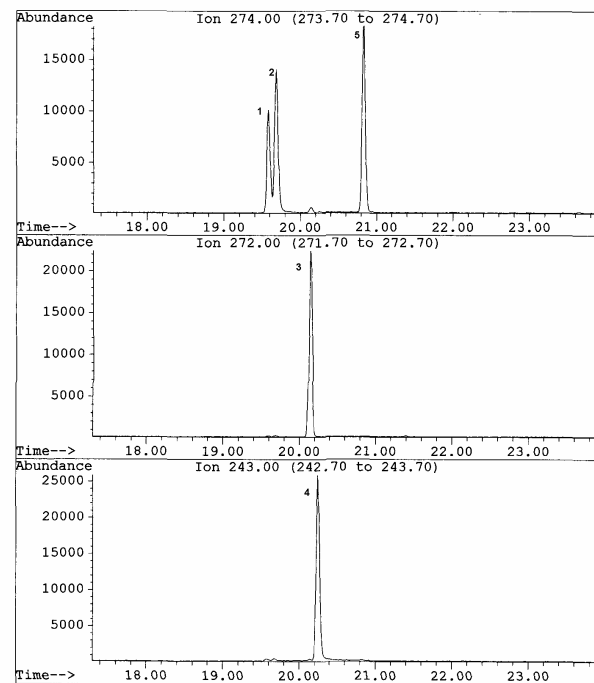


Figura 3.10. Cromatograma cGC-MS *SIM* de una solución patrón de 10 ng/μl. Fragmentos seleccionados m/z 274, m/z 272 y m/z 243. Picos: (1) 5α-An-3α-ol; (2) 5α-An-3β-ol; (3) 5α-An; (4) 5α-androstan-3α-ol; (5) 5α-androstan-3-ona

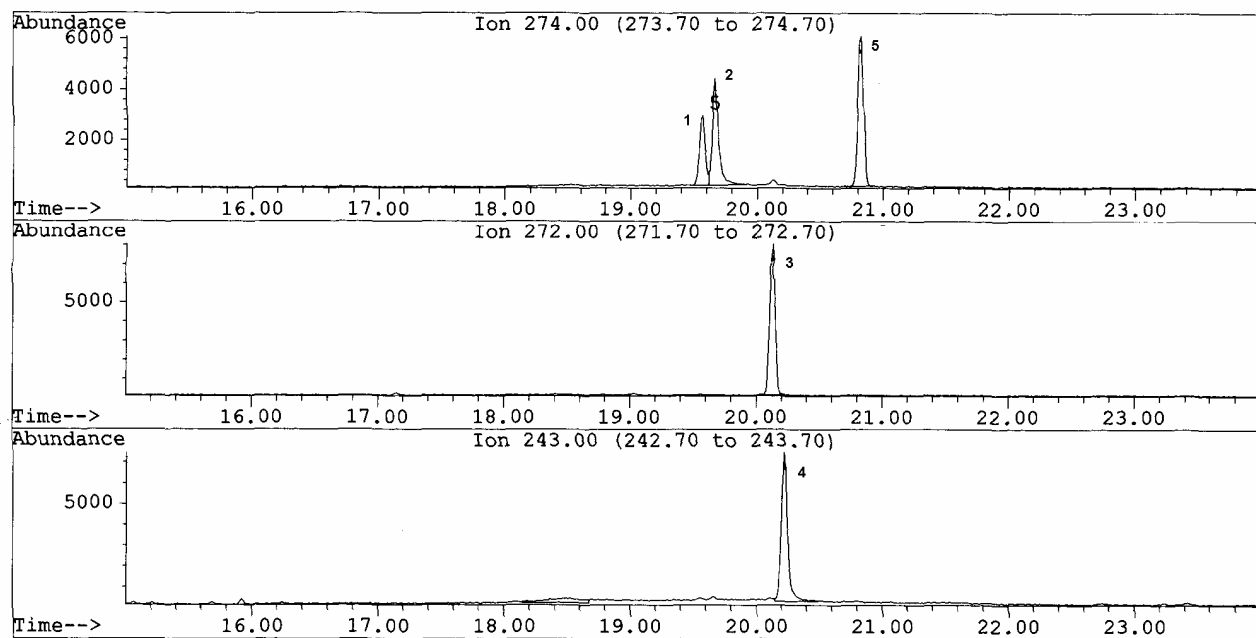


Figura 3.11. Cromatograma cGC-MS *SIM* de un extracto de grasa dorsal de cerdo fortificada con 1  $\mu\text{g/g}$  de: (1)  $5\alpha$ -An- $3\alpha$ -ol; (2)  $5\alpha$ -An- $3\beta$ -ol; (3)  $5\alpha$ -An; (4)  $5\alpha$ -androstano- $3\alpha$ -ol; (5)  $5\alpha$ -androstano- $3$ -ona. Fragmentos seleccionados m/z 274, m/z 272 y m/z 243

Diversas muestras de grasa dorsal de cerdo que no presentaran concentraciones detectables ( $<0,10 \mu\text{g/g}$ ) de androstenona,  $5\alpha\text{-An-}3\alpha\text{-ol}$  y  $5\alpha\text{-An-}3\beta\text{-ol}$  se seleccionaron de un matadero comercial y se utilizaron para el procedimiento de fortificación y en la validación del método analítico desarrollado. La linealidad se evaluó en el intervalo de concentraciones de  $0,025\text{-}2,0 \mu\text{g/g}$ . Las ecuaciones de las rectas obtenidas y los coeficientes de regresión al representar la concentración versus el área fueron: androstenona ( $y = 851585 x + 30700$ ,  $R^2=0,9943$ ),  $5\alpha\text{-An-}3\alpha\text{-ol}$  ( $y = 321693 x + 99045$ ,  $R^2=0,9929$ ) y  $5\alpha\text{-An-}3\beta\text{-ol}$  ( $y = 410029 x + 15969$ ,  $R^2=0,9905$ ).

La repetibilidad se estudió en un total de  $n=5$  muestras de grasa dorsal de cerdo fortificadas con  $0,25 \mu\text{g/g}$  y  $2,0 \mu\text{g/g}$  de androstenona,  $5\alpha\text{-An-}3\alpha\text{-ol}$  y  $5\alpha\text{-An-}3\beta\text{-ol}$ . La repetibilidad de los patrones internos se evaluó a  $2 \mu\text{g/g}$ , concentración añadida a los extractos grasos. Los coeficientes de variación de las áreas absolutas fueron ligeramente superiores en las muestras de mayor concentración ( $2,0 \mu\text{g/g}$ ) (Tabla 3.4). Los valores de los coeficientes de variación en las muestras de grasa fortificadas con  $0,25 \mu\text{g/g}$  de  $5\alpha\text{-An}$ ,  $5\alpha\text{-An-}3\alpha\text{-ol}$  y  $5\alpha\text{-An-}3\beta\text{-ol}$  fueron inferiores al 8%. Los coeficientes de variación del área absoluta obtenidos de los patrones internos utilizados en este estudio fueron inferiores al 10% (Tabla 3.5). Los tiempos de retención presentaron unos valores de coeficientes de variación inferiores al 0,02 %. Estos resultados mostraron la aplicabilidad del método desarrollado para la determinación de androstenona y androstenoles en muestras de grasa dorsal porcina.

La cuantificación de los compuestos separados cromatográficamente se realizó mediante la utilización de patrones internos. La selección de un patrón interno adecuado es de gran relevancia en el desarrollo de un método analítico. Por otra parte, la determinación del factor de respuesta de la androstenona y de los androstenoles frente a los patrones internos seleccionados permite comparar la intensidad de las respuestas generadas, que pueden ser muy dispares según el sistema de detección utilizado. Las ecuaciones de linealidad obtenidas al representar gráficamente  $\text{Area}_{5\alpha\text{-An}}/\text{Area}_{\text{IS-ona}}$  versus  $\text{masa}_{5\alpha\text{-An}}/\text{masa}_{\text{IS-ona}}$ ,  $\text{Area}_{5\alpha\text{-An-}3\alpha\text{-ol}}/\text{Area}_{\text{IS-oles}}$  versus  $\text{masa}_{5\alpha\text{-An-}3\alpha\text{-ol}}/\text{masa}_{\text{IS-oles}}$  y  $\text{Area}_{5\alpha\text{-An-}3\beta\text{-ol}}/\text{Area}_{\text{IS-oles}}$  versus  $\text{masa}_{5\alpha\text{-An-}3\beta\text{-ol}}/\text{masa}_{\text{IS-oles}}$  fueron, respectivamente:  $y = 0,7906 x - 0,0186$  ( $R^2=0,9993$ ),  $y = 2,9632 x + 0,0493$  ( $R^2=0,9961$ ) y  $y = 2,3989 x + 0,094$  ( $R^2=0,9936$ ). El valor del factor de respuesta corresponde a la pendiente de las rectas obtenidas. Así, las respuestas relativas

de los diferentes compuestos respecto a los patrones internos (5 $\alpha$ -androstan-3-ona y 5 $\alpha$ -androstan-3 $\alpha$ -ol) fueron: 0,7906 para la androstenona, 2,9632 para el 5 $\alpha$ -An-3 $\alpha$ -ol y 2,3989 para el 5 $\alpha$ -An-3 $\beta$ -ol.

Los porcentajes de recuperación relativos a los patrones internos de la androstenona y los androstenoles obtenidos a diferentes concentraciones se presentan en la Tabla 3.6. Los porcentajes medios fueron 97,98%  $\pm$  1,44 (5 $\alpha$ -An), 96,66%  $\pm$  3,57 (5 $\alpha$ -An-3 $\alpha$ -ol) y 94,84%  $\pm$  6,21 (5 $\alpha$ -An-3 $\beta$ -ol). Los valores de los coeficientes de variación de la androstenona fueron similares para todas las concentraciones estudiadas, aunque se incrementó ligeramente a una concentración de 0,50  $\mu$ g/g. No obstante, los coeficientes de variación de los androstenoles aumentaron con la concentración hasta valores superiores a 9,5% a una concentración de 2,0  $\mu$ g/g.



Tabla 3.4. Variabilidad de los tiempos de retención y del área absoluta de la androstenona y de los androstenoles en muestras de grasa dorsal (n=5) a las que se adicionaron 0,25 µg/g y 2,0 µg/g de los compuestos estudiados. Análisis mediante GC-MS.

	5α-androst-16-en-3-ona				5α-androst-16-en-3α-ol				5α-androst-16-en-3β-ol			
	0,25 µg/g		2,0 µg/g		0,25 µg/g		2,0 µg/g		0,25 µg/g		2,0 µg/g	
	t <sub>R</sub>	Área	t <sub>R</sub>	Área	t <sub>R</sub>	Área	t <sub>R</sub>	Área	t <sub>R</sub>	Área	t <sub>R</sub>	Área
X	20,754	261346,20	20,760	1507461,80	20,165	94519,60	20,179	495936,80	20,277	121038,20	20,280	652201,40
DE	0,001	19013,52	0,001	138833,03	0,004	7316,96	0,001	53206,86	0,002	7739,80	0,001	62193,96
CV	0,005	7,28	0,004	9,21	0,017	7,74	0,007	10,73	0,013	6,39	0,003	9,54

X: media; DE: desviación estándar; CV: coeficiente de variación; t<sub>R</sub>: tiempo de retención

Tabla 3.5. Variabilidad de los tiempos de retención y del área de la 5 $\alpha$ -androstan-3-ona y del 5 $\alpha$ -androstan-3 $\alpha$ -ol en muestras de grasa dorsal (n=10) con una concentración de 2,0  $\mu$ g/g. Análisis mediante GC-MS.

	5 $\alpha$ -androstan-3-ona		5 $\alpha$ -androstan-3 $\alpha$ -ol	
	t <sub>R</sub>	Área	t <sub>R</sub>	Área
X	21,460	1267577,32	20,841	895296,52
DE	0,002	119709,93	0,001	87088,34
CV	0,007	9,44	0,006	9,73

X: media; DE: desviación estándar; CV: coeficiente de variación; t<sub>R</sub>: tiempo de retención

Tabla 3.6. Eficiencia de extracción de la androstenona y de los androstenoles en muestras de grasa dorsal de cerdo de distintas concentraciones. Análisis mediante GC-MS.

Concentración ( $\mu\text{g/g}$ )	n	5 $\alpha$ -androst-16-en-3-ona		5 $\alpha$ -androst-16-en-3 $\alpha$ -ol		5 $\alpha$ -androst-16-en-3 $\beta$ -ol	
		Recuperación <sup>a</sup> $\pm$ DE	CV	Recuperación <sup>a</sup> $\pm$ DE	CV	Recuperación <sup>a</sup> $\pm$ DE	CV
0,25	8	99,07 $\pm$ 3,94	3,98	94,55 $\pm$ 3,21	3,39	100,48 $\pm$ 4,72	4,70
0,5	5	95,69 $\pm$ 5,39	5,63	95,66 $\pm$ 2,36	2,47	96,93 $\pm$ 3,17	3,27
1,0	5	97,80 $\pm$ 3,50	3,58	102,61 $\pm$ 3,37	3,28	98,86 $\pm$ 2,84	2,87
1,5	5	99,32 $\pm$ 2,56	2,58	93,49 $\pm$ 4,91	5,25	84,90 $\pm$ 4,12	4,85
2,0	8	98,04 $\pm$ 2,71	2,76	96,97 $\pm$ 9,23	9,52	93,03 $\pm$ 9,73	10,46

<sup>a</sup>: expresada en %; n: número de muestras analizadas; DE: desviación estándar; CV: coeficiente de variación

### 3.1.3. Determinación de indol y escatol en muestras de músculo longissimus dorsi de cerdo mediante cromatografía líquida en fase normal y detección por fluorescencia (Rius y García-Regueiro, 1999 Submitted)

La concentración de los compuestos relacionados con la presencia de olor sexual en el tejido adiposo se utiliza para la clasificación de las canales de cerdos enteros. No obstante, la bibliografía consultada no describe estudios que evalúen la concentración de indol y escatol en músculo longissimus dorsi, aunque se considera que existe una correlación entre las concentraciones de estas sustancias de estos tejidos.

El procedimiento de extracción utilizado en este trabajo, mediante una solución de cloroformo:metanol (2:1), permitió una extracción completa del indol y del escatol y de la grasa intramuscular del tejido muscular. La mayor dificultad observada en la extracción de los compuestos estudiados fue la coextracción del agua del músculo. Las muestras se disgregaron previamente en presencia de sulfato sódico anhidro para evitar este problema, aunque la presencia de agua en los extractos obtenidos obligó a realizar una partición posterior con una solución salina. Esta operación es crítica, porque pueden producirse pérdidas de los compuestos de mayor polaridad y, además, supone un incremento de los tiempos de análisis y la utilización de un mayor volumen de disolventes.

El análisis cromatográfico del indol y del escatol se efectuó por cromatografía líquida en fase normal, según se describe en el apartado 2.3.1.3. Las condiciones cromatográficas establecidas en la separación de estos compuestos obligó a evaporar los extractos para eliminar el cloroformo y resuspender los extractos secos en hexano:2-propanol (92:8). El cromatograma de HPLC-FN correspondiente a una muestra de músculo longissimus dorsi de cerdo fortificado con 0,30 µg/g de indol, escatol y 7-etilindol (patrón interno) se presenta en la Figura 3.12.

La linealidad y repetibilidad del método analítico desarrollado se evaluaron en muestras de músculo longissimus dorsi previamente analizadas para comprobar la ausencia de concentraciones detectables de indol y escatol. Las rectas de linealidad obtenidas en el intervalo de concentraciones de 0,05-0,40 µg/g fueron:  $y = 1 \times 10^6 x + 7693,62$  ( $R^2=0,9975$ ) para el indol y  $y = 3 \times 10^6 x + 13476$  ( $R^2=0,9939$ ) para el escatol.

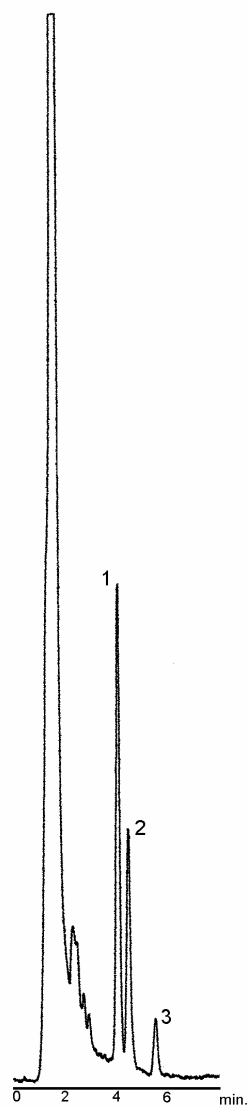


Figura 3.12. Cromatograma de HPLC-FN y detección por fluorescencia ( $\lambda_{exc}=280$  nm y  $\lambda_{em}=360$  nm) de un extracto de músculo *longissimus dorsi* porcino. Identificación de los picos: (1) 7-etilindol; (2) escatol; (3) indol

Los tiempos de retención presentaron unos coeficientes de variación inferiores al 0,25 % y la variabilidad de las áreas absolutas fue inferior a 6,50 % a una concentración de 0,20 µg/g. Los resultados obtenidos mostraron una mayor variabilidad al evaluar la repetibilidad a concentraciones inferiores (0,05 µg/g) y superiores (0,40 µg/g), como se observa en la Tabla 3.7.

La eficiencia de la recuperación obtenida para el escatol e indol a diversas concentraciones se muestra en la Tabla 3.8. Los valores medios de los porcentajes de recuperación calculados respecto al patrón interno utilizado fueron 94,45% ± 5,22 para el escatol y 83,63 % ± 6,35 para el indol.

#### 3.1.3.1. Análisis de escatol e indol en muestras de músculo (longissimus dorsi), grasa de recubrimiento y grasa dorsal mediante HPLC-FN

El análisis de muestras de grasa, dorsal y de recubrimiento situada alrededor del músculo longissimus dorsi (LD), se realizó según se describe en el apartado 2.3.1.1.

La mayor dificultad que ofreció el tratamiento del músculo fue el elevado contenido en agua de la muestra (apartado 3.1.3). La homogeneización del músculo longissimus dorsi en sulfato sódico anhidro y la extracción líquido-líquido permitieron su eliminación de los extractos, aunque alargaron el desarrollo del procedimiento analítico.

La determinación de indol y escatol en muestras de grasa dorsal, grasa de recubrimiento y músculo longissimus dorsi procedentes de una misma canal permitió conocer su concentración en los tejidos evaluados. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3.9. La concentración media de indol fue significativamente superior ( $P < 0,05$ ) en las muestras de grasa (grasa dorsal y de recubrimiento) y la concentración media de escatol fue significativamente diferente entre las muestras de grasa dorsal y músculo longissimus dorsi ( $P < 0,05$ ). Sin embargo, la concentración media de escatol no difirió significativamente de la grasa de recubrimiento del resto de tejidos estudiados. Estos resultados indican que los compuestos indólicos estudiados se acumulan principalmente en el tejido adiposo, aunque también pueden depositarse en el músculo.

Tabla 3.7. Repetibilidad del método analítico desarrollado en 5 muestras de músculo *longissimus dorsi* de cerdo fortificadas con diferentes concentraciones de indol y escatol. Análisis mediante HPLC-FN.

µg/g adicionados		Escatol			Indol		
		X	DE	CV	X	DE	CV
0,05	t <sub>R</sub>	4,64	0,005	0,11	5,51	0,006	0,10
	Área	54228,50	6863,35	12,66	15493,80	1853,58	11,96
	Área Relativa	27,81	1,85	6,65	8,52	0,72	8,45
0,20	t <sub>R</sub>	4,62	0,01	0,22	5,49	0,01	0,21
	Área	259066,83	8438,11	3,26	68970,67	4482,81	6,50
	Área Relativa	57,07	0,25	0,44	15,19	0,64	4,20
0,40	t <sub>R</sub>	4,61	0,01	0,22	5,47	0,01	0,18
	Área	513223,33	58704,64	11,44	134082,83	11673,07	8,71
	Área Relativa	66,30	4,35	6,56	18,83	2,37	12,59

t<sub>R</sub>: tiempos de retención; X: media; DE: desviación estándar; CV: coeficiente de variación

Tabla 3.8. Rendimiento de extracción (%) del escatol e indol mediante el método desarrollado en un total de 10 muestras de músculo *longissimus dorsi* de cerdo. Análisis mediante HPLC-FN.

µg/g adicionados	Indol		Escatol	
	% Recuperación <sup>a</sup> ± DE	CV (%)	% Recuperación <sup>a</sup> ± DE	CV (%)
0,05	87,88 ± 2,37	2,69	96,35 ± 5,31	5,51
0,10	82,53 ± 3,14	3,80	90,53 ± 4,77	5,27
0,20	90,25 ± 1,57	1,74	93,93 ± 4,07	4,33
0,30	75,94 ± 7,30	9,61	93,96 ± 8,09	8,61
0,40	81,55 ± 4,61	5,66	97,47 ± 3,80	3,91

<sup>a</sup> cálculos respecto a patrón interno; DE: desviación estándar; CV: coeficiente de variación



Tabla 3.9. Media por mínimos cuadrados (X) y error típico (ET) de la concentración (ng/g de tejido) de indol y escatol en grasa dorsal, grasa de recubrimiento y músculo *longissimus dorsi* de cerdo entero. Análisis mediante HPLC-FN y detección por fluorescencia.

	Grasa dorsal	<i>longissimus dorsi</i>	Grasa de recubrimiento	ET	Significación <sup>1</sup>
Indol	311,78 <sup>a</sup>	57,90 <sup>b</sup>	234,78 <sup>a</sup>	175,97	*
Escatol	192,88 <sup>a</sup>	19,27 <sup>b</sup>	108,82 <sup>ab</sup>	113,33	*

<sup>1</sup> Nivel de significación: \* P< 0,05

Los cromatogramas de HPLC-FN y detección por fluorescencia correspondientes a muestras de grasa dorsal, grasa de recubrimiento y muestras de músculo longissimus dorsi se presentan en la Figura 3.13. La relación observada al representar gráficamente las concentraciones de indol y escatol en grasa dorsal versus las concentraciones de indol y escatol en músculo longissimus dorsi se presentan en la Figura 3.14. Las ecuaciones de las rectas de regresión obtenidas fueron: indol ( $y = 0,187x - 0,410$ ,  $R^2 = 0,828$ ) y escatol ( $y = 0,065x + 6,743$ ,  $R^2 = 0,392$ ). Según estos resultados, la concentraciones de escatol e indol en músculo longissimus dorsi no pueden predecirse a partir de las concentraciones determinadas en el tejido adiposo.

Los valores de los coeficientes de correlación de Pearson entre las concentraciones de escatol e indol de los diferentes tipos de muestras estudiadas se presentan en la Tabla 3.10. La concentración de indol en el tejido adiposo se correlacionó significativamente ( $r > 0,90$ ,  $P < 0,001$ ) con la concentración observada en el tejido muscular o en la grasa que recubre al músculo longissimus dorsi. Las concentraciones de escatol determinadas en muestras de grasa, dorsal y de recubrimiento, se correlacionaron significativamente entre si ( $r = 0,99$ ,  $P < 0,001$ ) y la concentración de escatol en grasa dorsal también se correlacionó con la concentración del tejido muscular, pero con un nivel de significación menor ( $r = 0,63$ ,  $P < 0,05$ ).

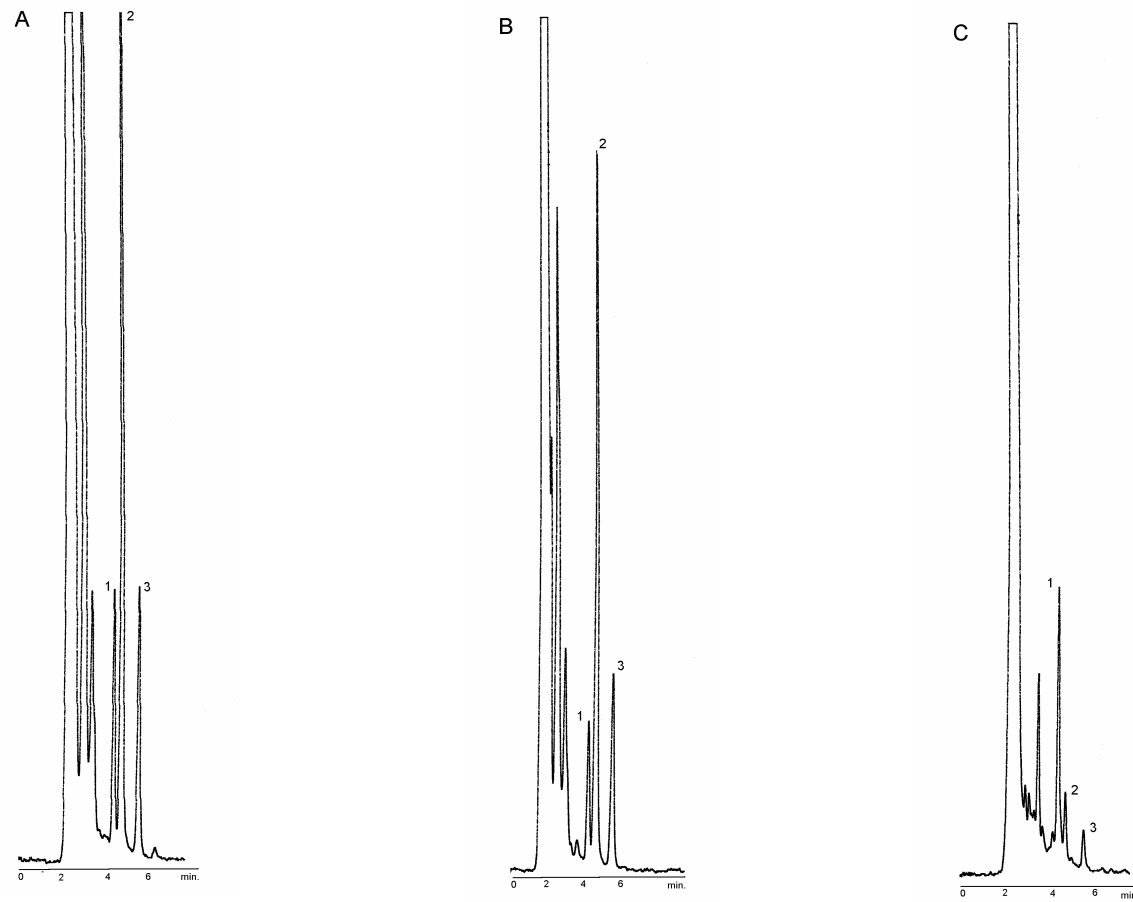
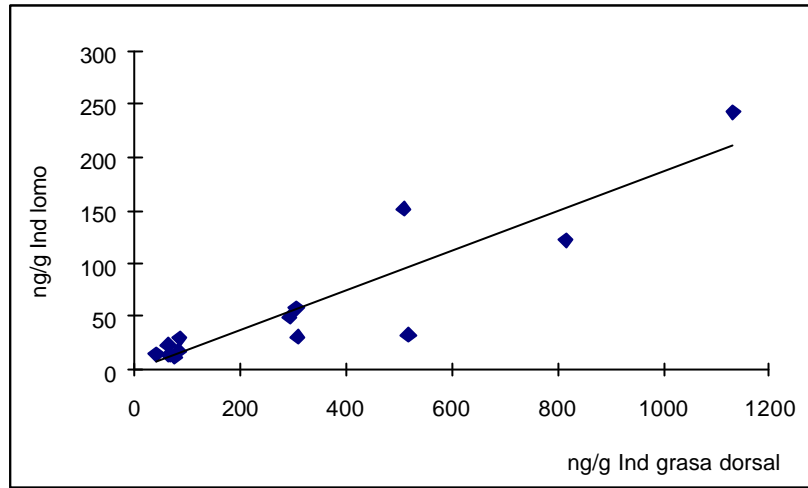


Figura 3.13. Cromatogramas de HPLC-FN y detección por fluorescencia ( $\lambda_{exc}=280$  nm y  $\lambda_{em}=360$  nm) de (A) muestra de grasa dorsal, (B) muestra de grasa de recubrimiento y (C) muestra de músculo *longissimus dorsi*. Picos: (1) 7-etilindol; (2) escatol; (3) indol

A



B

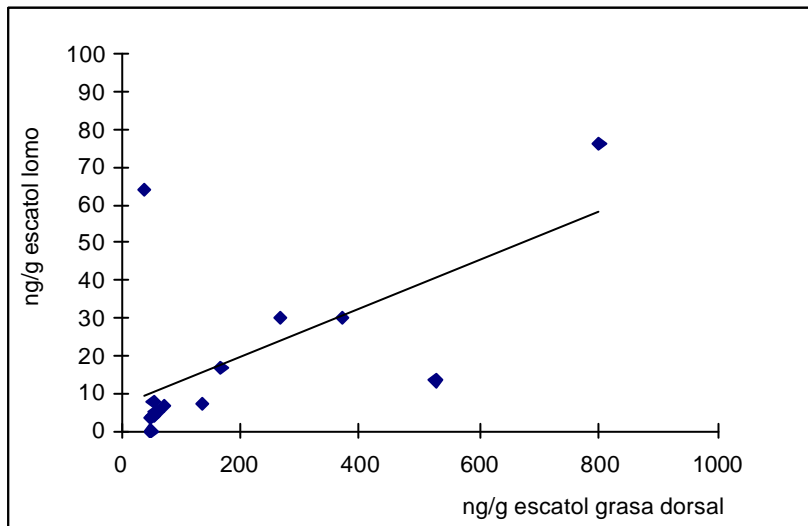


Figura 3.14. Comparación entre la concentración de indol (A) y de escatol (B) en muestras de grasa dorsal y muestras de músculo *longissimus dorsi*. Análisis mediante HPLC-FN. Las rectas de regresión fueron:  $y = 0,187 x - 0,410$  (indol) y  $y = 0,0646 x + 6,743$  (escatol)

Tabla 3.10. Coeficientes de correlación de *Pearson* entre las concentraciones de indol y escatol (ng/g) de muestras de grasa dorsal, grasa de recubrimiento y músculo *longissimus dorsi*. Análisis mediante HPLC-FN.

	GRASA DORSAL		<i>LONGISSIMUS DORSI</i>		GRASA RECUBRIMIENTO	
	Escatol	Indol	Escatol	Indol	Escatol	Indol
Escatol grasa dorsal	1,000	0,624*	0,632*	0,372	0,991***	0,630*
Indol grasa dorsal		1,000	0,388	0,914***	0,602*	0,995***
Escatol <i>longissimus dorsi</i>			1,000	0,310	0,646*	0,418
Indol <i>longissimus dorsi</i>				1,000	0,357	0,901***
Escatol grasa recubrimiento					1,000	0,621*

Nivel de significación: \*\*\* P< 0,001; \*\* P<0,01; \* P<0,05

### 3.1.4. Desarrollo de metodologías de purificación. Fraccionamiento de los extractos grasos mediante columnas de extracción de sílica

El principal propósito del desarrollo de estas metodologías analíticas fue el estudio de muestras de grasa dorsal de cerdos enteros con notaciones sensoriales de olor sexual y concentraciones de escatol y androstenona inferiores a los umbrales de aceptabilidad (0,10 µg/g y 0,50 µg/g, respectivamente). Las metodologías de purificación permitieron la eliminación de las interferencias debidas a la presencia de grasa y la obtención de diferentes fracciones del extracto graso, que permitieron evaluar la presencia de otros compuestos que pudieran contribuir o explicar el desarrollo del defecto sensorial en estas canales.

#### 3.1.4.1. Tratamiento de las muestras

La extracción con disolventes orgánicos de los compuestos relacionados con el olor sexual se ha descrito ampliamente en la bibliografía. La solución de cloroformo:metanol (2:1) facilitó la extracción de los compuestos lipofílicos presentes en el tejido adiposo (Folch y col., 1957) y la extracción del indol, escatol, androstenona y androstenoles. Los extractos resultantes fueron estables a -40°C durante un tiempo aproximado de tres meses. La extracción de estas sustancias con éter dietílico o mezclas de hexano:éter dietílico (1:1) permitió la obtención de rendimientos elevados. El principal inconveniente que presentó la utilización de estos disolventes es su volatilidad. La purificación de las sustancias responsables del olor sexual del resto de los componentes lipídicos presentes en la grasa también se evaluó mediante extracciones líquido-líquido, utilizando acetonitrilo como solución extractante. No obstante, a pesar de la recuperación de la androstenona, el extracto final presentó interferencias que dificultaron su posterior separación y determinación cromatográfica.

La coextracción de grasa junto los compuestos relacionados con el olor sexual fue la principal dificultad que ofreció la manipulación y estudio posterior de las muestras. La extracción con metanol y la refrigeración de los extractos metanólicos a -20°C eliminó parte del material lipídico. No obstante, los extractos resultantes aún presentaron un exceso de grasa, debido a que se limitó el tiempo de congelación para evitar la coprecipitación junto a la grasa del escatol, de la androstenona y de otros posibles compuestos.

#### 3.1.4.2. Purificación de los extractos de grasa mediante extracción en fase sólida con columnas de sílica

La purificación de los extractos de grasa se evaluó mediante la utilización de columnas de sílica con diferente capacidad de carga: minicolumnas de 500 mg y columnas de 2 y 10 gramos de sílica preparadas en el laboratorio. Las minicolumnas de sílica de 500 mg permitieron una aplicación máxima de 0,1 gramos de extracto graso, que dificultó la detección de los compuestos relacionados con el olor sexual, especialmente en los extractos de concentración baja. Además, la presencia de determinados compuestos originados por la degradación del material plástico de las columnas, a consecuencia del contacto con los disolventes utilizados, interfirió en la detección y determinación de las sustancias de interés. La utilización de columnas de 2 y 10 gramos de sílica, activadas durante una noche a 120°C y preparadas en el laboratorio, permitió la aplicación de 0,5 y 2 gramos del extracto graso, respectivamente, y aumentar la concentración de los compuestos de estudio en las diferentes fracciones obtenidas. El orden de elución del indol, escatol, androstenona,  $5\alpha$ -An-3 $\alpha$ -ol,  $5\alpha$ -An-3 $\beta$ -ol y de los respectivos patrones internos ( $5\alpha$ -androstan-3-ona y  $5\alpha$ -androstan-3 $\alpha$ -ol) se evaluó en soluciones patrón (Tabla 3.11) y la elución del escatol y de la androstenona mediante olfacción de las fracciones obtenidas por personas sensibles a la androstenona.

Los extractos purificados requirieron una purificación adicional mediante minicolumnas de aminopropilsílica, debido a la coelución de los triglicéridos y ácidos grasos junto al indol, escatol y la androstenona. La elución de los compuestos se realizó incrementando la polaridad de los eluyentes de forma gradual. El fraccionamiento con columnas aminopropilsílica permitió, además, la separación de los compuestos indólicos y la androstenona en fracciones distintas, que posteriormente se analizaron mediante distintas técnicas cromatográficas. El indol, escatol y 7-etilindol (patrón interno) se recuperaron en la primera fracción en éter dietílico:diclorometano:hexano (1:10:89). La androstenona y su patrón interno se recuperaron en la segunda fracción en cloroformo:metanol (2:1).

Tabla 3.11. Elución de los compuestos relacionados con el olor sexual en la purificación con columnas de sílica

	500 mg (Waters)	2 gramos sílica	10 gramos sílica
1F hexano	-	-	-
2F hexano:éter dietílico (9:1)	Indol, Escatol, 7-etilindol, 5 $\alpha$ -An, 5 $\alpha$ -An (IS)	Indol, Escatol, 7-etilindol, 5 $\alpha$ -An, 5 $\alpha$ -An (IS)	-
3F hexano:éter dietílico (8:2)	5 $\alpha$ -An-3 $\alpha$ -ol, 5 $\alpha$ -An-3 $\beta$ -ol, IS (oles)	5 $\alpha$ -An-3 $\alpha$ -ol, 5 $\alpha$ -An-3 $\beta$ -ol, IS (oles)	Indol, Escatol, 7-etilindol, 5 $\alpha$ -An, 5 $\alpha$ -An (IS)
4F hexano:éter dietílico (5:5)	-	-	5 $\alpha$ -An-3 $\alpha$ -ol, IS (oles)
5F éter dietílico	-	-	5 $\alpha$ -An-3 $\beta$ -ol
6F cloroformo:metanol (2:1)	-	-	

5 $\alpha$ -An: 5 $\alpha$ -androst-16-en-3-ona; 5 $\alpha$ -An-3 $\alpha$ -ol: 5 $\alpha$ -androst-16-en-3 $\alpha$ -ol; 5 $\alpha$ -An-3 $\beta$ -ol: 5 $\alpha$ -androst-16-en-3 $\beta$ -ol; 5 $\alpha$ -An (IS): 5 $\alpha$ -androstan-3-ona (patrón interno de la androstenona); IS (oles): 5 $\alpha$ -androstan-3 $\alpha$ -ol (patrón interno de los androstenoles)



### 3.1.4.3. Análisis cromatográfico

Distintas técnicas de separación y detección se evaluaron en la determinación cromatográfica de los compuestos relacionados con el olor sexual. La cromatografía de gases acoplada a detectores de ionización de llama permite el análisis de un amplio número de compuestos químicos, aunque la baja selectividad del sistema de detección y la carencia de información sobre la estructura química no asegura su identificación. Además, los porcentajes de recuperación disminuyeron debido a los tratamientos de purificación, especialmente los correspondientes al indol y a los androstenoles. Los compuestos indólicos se separaron del resto de picos eluidos de la columna, aunque su determinación entrañó ciertas dificultades debido a una simetría deficiente de los picos, a pesar de aplicar el procedimiento del efecto solvente. Las fracciones obtenidas se analizaron también mediante GC-NPD. La utilización de este detector, selectivo para compuestos con átomos de nitrógeno y/o fósforo, permitió aumentar la sensibilidad y selectividad de la detección para los compuestos derivados del indol. El sistema de inyección elegido (inyección on-column) evitó los problemas de degradación que pudieran producirse en el modo de inyección splitless.

El análisis cromatográfico de los compuestos indólicos también se efectuó mediante cromatografía líquida en fase normal, según se describe en el apartado 2.3.3.2.2.1. La fracción eluida de la minicolumna de aminopropilsilica se evaporó a sequedad y se redisolvió en hexano:2-propanol (92:8). El cromatograma de HPLC-FN y detección por fluorescencia correspondiente a un extracto de grasa purificado en una columna de sílica y, posteriormente, en una minicolumna aminopropilsilica se muestra en la Figura 3.15. La purificación mediante cromatografía en fase sólida eliminó los compuestos de características más hidrofóbicas de los extractos, como se aprecia en la comparación del cromatograma obtenido (Figura 3.15) con el presentado en la Figura 3.3.

La determinación cromatográfica de la androstenona y de los androstenoles se efectuó por cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas. Los espectros de masas generados por impacto electrónico en modo SCAN ofrecieron información espectral de todos los compuestos presentes en las

fracciones analizadas. El cromatograma obtenido mediante GC-MS en modo TIC de un extracto de grasa purificado en una columna de sílica y, posteriormente, en una columna aminopropilsilica se presenta en la Figura 3.16. La selección de los fragmentos de  $m/z$  272 y  $m/z$  274, característicos de la androstenona y de su patrón interno, permitió detectar la presencia de estos dos compuestos en los extractos. La eficacia del método de purificación empleado permitió la obtención de extractos libres de interferencias en la determinación cromatográfica.

El análisis cromatográfico de los androstenoles fue factible con la utilización de columnas capilares ligeramente polares (DB-5), como se comenta en el apartado 3.1.2. La obtención de los correspondientes derivados trimetilsilil de los androstenoles mejoró la simetría de los picos y su separación. El cromatograma de una solución patrón de los derivados del  $5\alpha$ -An- $3\alpha$ -ol,  $5\alpha$ -An- $3\beta$ -ol y de su correspondiente patrón interno y los espectros de masas característicos de estos compuestos se presenta en la Figura 3.17. El cromatograma de GC-MS en modo SCAN correspondiente a la cuarta fracción de un extracto de grasa purificado mediante una columna de 10 gramos de sílica, que permitió la recuperación del  $5\alpha$ -An- $3\alpha$ -ol y  $5\alpha$ -androstan- $3\alpha$ -ol (patrón interno) se presenta en la Figura 3.18. La selección de los fragmentos de  $m/z$  241 y  $m/z$  258, característicos del  $5\alpha$ -An- $3\alpha$ -ol y de su patrón interno, facilitó su identificación en el cromatograma generado en modo de ión total (TIC) (Figura 3.19).

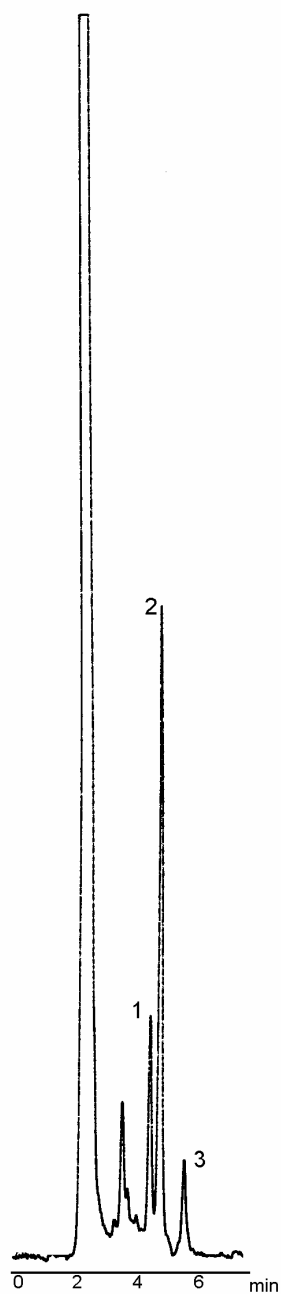


Figura 3.15. Cromatograma de HPLC-FN y detección por fluorescencia ( $\lambda_{exc}=280$  nm y  $\lambda_{em}=360$  nm) de un extracto de grasa fortificado con 0,20  $\mu\text{g/g}$  de escatol e indol correspondiente a la primera fracción eluida en columnas de aminopropilsilica. Picos: (1) 7-etilindol; (2) escatol; (3) indol

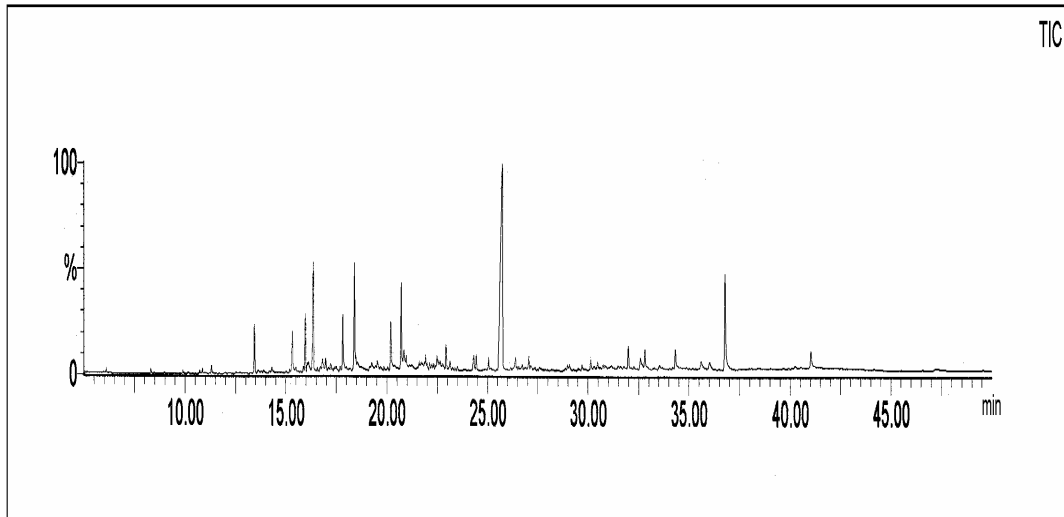
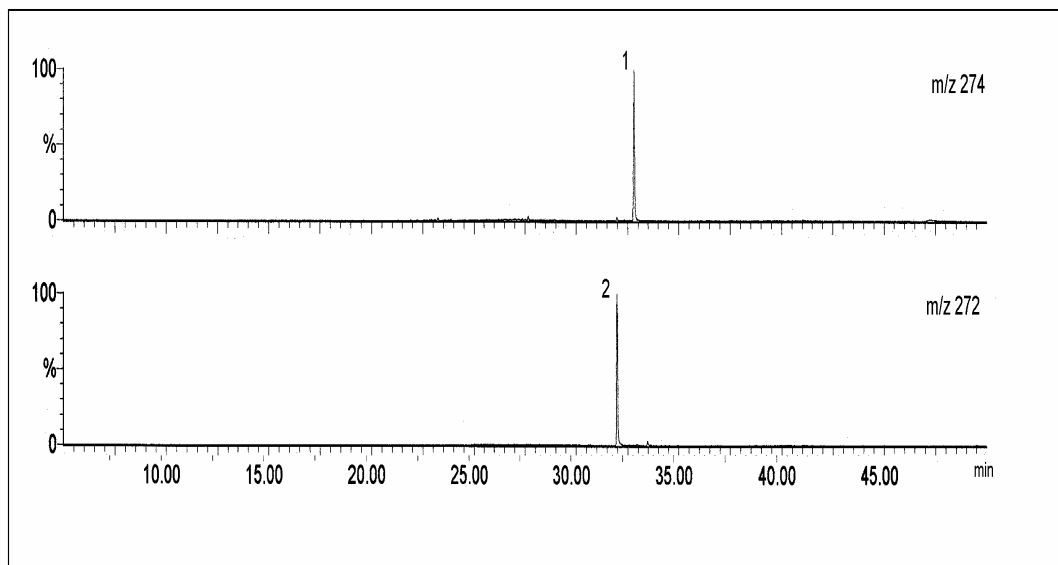
**A****B**

Figura 3.16. Cromatograma GC-MS en modo SCAN de un extracto de grasa fortificado con 1  $\mu\text{g/g}$  de androstenona y  $5\alpha$ -androstan-3-ona correspondiente a la segunda fracción eluida en columnas de aminopropilsilica. (A) ion total y (B) seleccionando los fragmentos de  $m/z$  272 y  $m/z$  274. Picos: (1)  $5\alpha$ -androstan-3-ona; (2)  $5\alpha$ -androst-16-en-3-ona

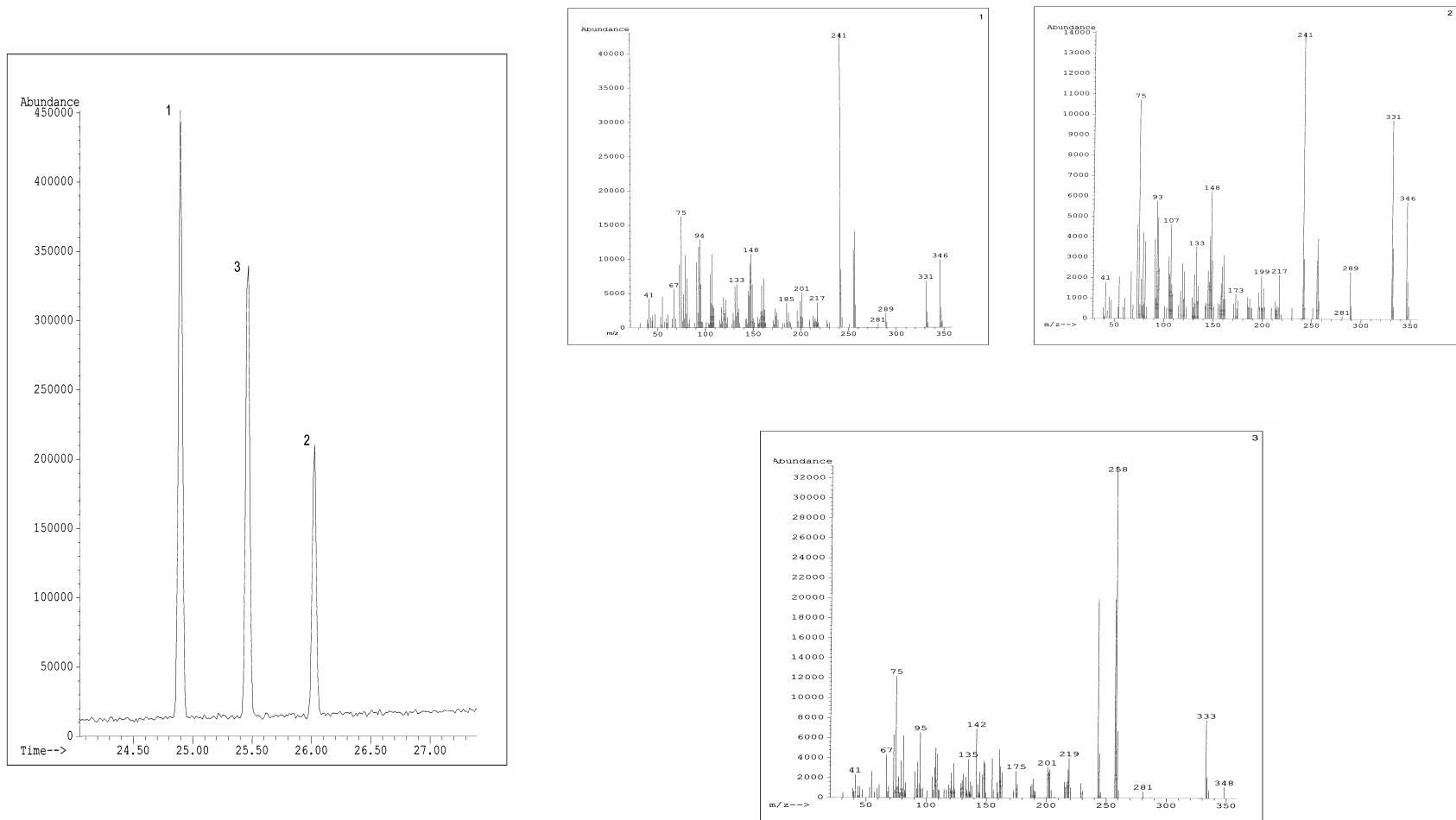


Figura 3.17. Cromatograma de GC-MS en modo *SCAN* de los derivados trimetilsilil de una solución patrón: (1) 5 $\alpha$ -androst-16-en-3 $\alpha$ -ol; (2) 5 $\alpha$ -androst-16-en-3 $\beta$ -ol; (3) 5 $\alpha$ -androstan-3 $\alpha$ -ol y sus respectivos espectros de masas

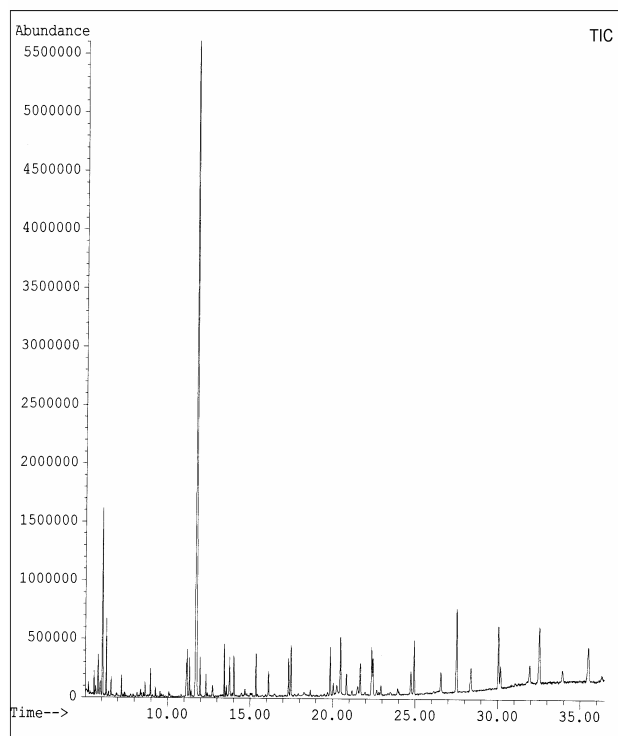


Figura 3.18. Cromatograma de ion total en modo SCAN de un extracto de grasa fortificado con 1 µg/g de 5α-androst-16-en-3α-ol y 5α-androstan-3α-ol correspondiente a la cuarta fracción eluida de una columna de sílica

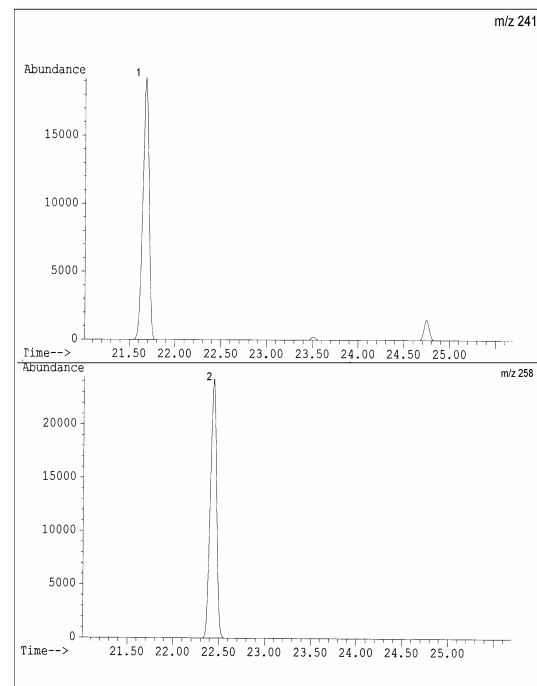


Figura 3.19. Cromatograma en modo SCAN de un extracto de grasa fortificado con 1 µg/g de 5α-androst-16-en-3α-ol y 5α-androstan-3α-ol seleccionando los fragmentos de m/z 241 y m/z 258. Picos: (1) 5α-androst-16-en-3α-ol; (2) 5α-androstan-3α-ol

Diversas muestras de grasa dorsal de cerdo sin concentraciones detectables de indol, escatol, androstenona,  $5\alpha$ -An- $3\alpha$ -ol,  $5\alpha$ -An- $3\beta$ -ol se seleccionaron en un matadero comercial y se utilizaron para el procedimiento de fortificación en la validación del método desarrollado. La linealidad se evaluó en el intervalo de concentraciones de 0,05-0,40  $\mu\text{g/g}$  para el escatol e indol y de 0,5-2,0  $\mu\text{g/g}$  para la androstenona y los androstenoles. Las ecuaciones de las rectas de regresión obtenidas mediante la utilización de columnas de 2 y 10 gramos de sílica y los valores de los coeficientes de regresión correspondientes a la representación de la concentración versus el área de cada compuesto estudiado se presentan en la Tabla 3.12.

Como se ha comentado en el apartado 3.1.2, la determinación del factor de respuesta de la androstenona y de los androstenoles respecto a sus respectivos patrones internos es de gran importancia para el aspecto cuantitativo del método analítico. Las ecuaciones de linealidad obtenidas al representar gráficamente  $\text{Area}_{5\alpha\text{-An}}/\text{Areal}_{\text{S-ona}}$  versus  $\text{masa}_{5\alpha\text{-An}}/\text{masa}_{\text{S-ona}}$ ,  $\text{Area}_{5\alpha\text{-An-}3\alpha\text{-ol}}/\text{Areal}_{\text{S-oles}}$  versus  $\text{masa}_{5\alpha\text{-An-}3\alpha\text{-ol}}/\text{masa}_{\text{S-oles}}$  y  $\text{Area}_{5\alpha\text{-An-}3\beta\text{-ol}}/\text{Areal}_{\text{S-oles}}$  versus  $\text{masa}_{5\alpha\text{-An-}3\beta\text{-ol}}/\text{masa}_{\text{S-oles}}$  fueron respectivamente:  $y = 1,3012x - 0,0928$  ( $R^2=0,9875$ ),  $y = 1,3315x + 0,007$  ( $R^2=0,9951$ ) y  $y = 0,5594x + 0,0696$  ( $R^2=0,9822$ ). El factor de respuesta está determinado por la pendiente de las rectas obtenidas y los valores obtenidos para los compuestos estudiados fueron: 1,3012 para la androstenona, 1,3315 para el  $5\alpha$ -An- $3\alpha$ -ol y 0,5594 para el  $5\alpha$ -An- $3\beta$ -ol.

Los porcentajes de recuperación de los compuestos indólicos y de los esteroides correspondientes a la purificación de muestras de grasa dorsal con columnas de 2 y 10 gramos de sílica se presentan en la Tabla 3.13 y en la Tabla 3.14, respectivamente. Los porcentajes se calcularon respecto a los patrones internos utilizados, excepto para el  $5\alpha$ -An- $3\beta$ -ol. La composición de las fracciones que contenían los androstenoles varió según si el procedimiento de purificación se realizó en columnas de 10 gramos o de 2 gramos. Los resultados referentes al  $5\alpha$ -An- $3\beta$ -ol se calcularon respecto patrón externo ya que este compuesto no se eluyó en las columnas de 10 gramos junto al patrón interno utilizado para los androstenoles (ver tabla 3.11).

Tabla 3.12. Linealidad del indol, escatol, androstenona y androstenoles en muestras de grasa dorsal purificadas con columnas de 2 y 10 gramos de sílica. Análisis mediante HPLC-FN y GC-MS.

	Intervalo de concentración	2 gramos sílica		10 gramos sílica	
Indol	0,05-0,4 µg/g	Y= 126,01 x + 3,081	R <sup>2</sup> =0,9877	Y= 253,11 x - 0,797	R <sup>2</sup> =0,9923
Escatol	0,05-0,4 µg/g	Y= 704,72 x + 11,636	R <sup>2</sup> =0,9885	Y= 903,51 x - 4,267	R <sup>2</sup> =0,9965
5α-androst-16-en-3-ona	0,5-2 µg/g	Y= 54,89 x - 1,733	R <sup>2</sup> =0,9998	Y= 1272,31 x + 100,276	R <sup>2</sup> =0,9959
5α-androst-16-en-3α-ol	0,5-2 µg/g	Y= 2,59 x + 0,025	R <sup>2</sup> =0,9809	Y= 6057,01 x + 2181,65	R <sup>2</sup> =0,9464
5α-androst-16-en-3β-ol	0,5-2 µg/g	Y= 2,90 x + 0,189	R <sup>2</sup> =0,9753	Y= 6007,18 x + 456,67	R <sup>2</sup> =0,9791



Tabla 3.13. Porcentajes de recuperación del indol, escatol, androstenona y androstenoles en muestras de grasa dorsal purificadas con columnas de 2 gramos de sílica. Repetibilidad de la cuantificación de los compuestos respecto a los patrones internos utilizados. Análisis mediante HPLC-FN y GC-MS.

	Indol	Escatol	5 $\alpha$ -An	5 $\alpha$ -An-3 $\alpha$ -ol	5 $\alpha$ -An-3 $\beta$ -ol
Muestra 1	44,66	65,24	63,20	59,25	53,26
Muestra 2	46,16	75,39	52,18	43,52	45,62
Muestra 3	27,44	56,97	61,42	49,56	40,87
Muestra 4	21,35	45,18	65,37	38,74	35,96
Muestra 5	35,18	39,98	64,86	41,91	50,13
X	34,96	56,55	61,41	46,60	45,17
DE	10,74	14,44	5,38	8,09	6,96
CV	30,72	25,54	8,77	17,37	15,40

5 $\alpha$ -An: 5 $\alpha$ -androst-16-en-3-ona; 5 $\alpha$ -An-3 $\alpha$ -ol: 5 $\alpha$ -androst-16-en-3 $\alpha$ -ol; 5 $\alpha$ -An-3 $\beta$ -ol: 5 $\alpha$ -androst-16-en-3 $\beta$ -ol

X: media; DE: desviación estándar; CV: coeficiente de variación

Tabla 3.14. Porcentajes de recuperación del indol, escatol, androstenona y androstenoles en muestras de grasa dorsal purificadas con columnas de 10 gramos de sílica. Repetibilidad de la cuantificación de los compuestos respecto a los patrones internos utilizados. Análisis mediante HPLC-FN y GC-MS.

	Indol	Escatol	5 $\alpha$ -An	5 $\alpha$ -An-3 $\alpha$ -ol	5 $\alpha$ -An-3 $\beta$ -ol <sup>a</sup>
Muestra 1	90,72	93,25	103,56	98,80	69,27
Muestra 2	92,67	89,37	99,43	93,23	73,12
Muestra 3	96,42	99,13	99,12	102,37	76,93
Muestra 4	91,26	102,58	100,25	105,21	68,42
Muestra 5	89,63	92,34	98,82	97,02	70,41
X	92,14	95,33	100,24	99,33	71,63
DE	2,63	5,38	1,93	4,65	3,45
CV	2,85	5,64	1,93	4,68	4,82

<sup>a</sup> Cálculos respecto patrón externo

5 $\alpha$ -An: 5 $\alpha$ -androst-16-en-3-ona; 5 $\alpha$ -An-3 $\alpha$ -ol: 5 $\alpha$ -androst-16-en-3 $\alpha$ -ol; 5 $\alpha$ -An-3 $\beta$ -ol: 5 $\alpha$ -androst-16-en-3 $\beta$ -ol

X: media; DE: desviación estándar; CV: coeficiente de variación

### 3.2. Aplicación de las metodologías desarrolladas en el análisis de muestras de grasa dorsal de cerdo entero y hembras previamente clasificadas según los resultados de métodos no específicos

#### 3.2.1. Determinación de indol y escatol en muestras de grasa dorsal procedente de cerdos enteros y hembras mediante HPLC-FN y detección por fluorescencia

Los resultados correspondientes a las concentraciones medias de indol, escatol y a la concentración suma de ambos compuestos en muestras de grasa dorsal de cerdos enteros y hembras se presentan en las Tablas 3.15 - 3.19.

La concentración de indol fue significativamente distinta entre los diversos grupos de concentraciones evaluados ( $P < 0,05$ , Tabla 3.15). La concentración media de indol del grupo de muestras clasificadas con concentraciones elevadas de escatol (AA y AB) fue significativamente superior al resto de grupos estudiados. Las concentraciones medias de indol de las muestras de grasa pertenecientes a los grupos de concentraciones bajas de escatol (BB y BA) no se diferenciaron significativamente de las muestras del grupo de concentraciones medias (MM) y del grupo de hembras. Además, la concentración media de indol no difirió significativamente según la evaluación sensorial de los panelistas (Tabla 3.16).

Las muestras de grasa clasificadas con concentraciones de escatol elevadas (AA y AB) mediante el método colorimétrico presentaron una concentración media de escatol significativamente superior al resto de grupos establecidos ( $P < 0,001$ , Tabla 3.15). Las muestras de grasa clasificadas con olor sexual mediante análisis sensorial presentaron una concentración media de escatol significativamente superior en comparación a las muestras control ( $P < 0,05$ , Tabla 3.16).

Las medias de la concentración suma de indol y escatol también fueron significativamente superiores en los grupos que presentaron concentraciones elevadas de escatol, en concordancia con los resultados del método colorimétrico ( $P < 0,001$ , Tabla 3.15).

Tabla 3.15. Medias por mínimos cuadrados (X) y error típico (ET) de las concentraciones ( $\mu\text{g/g}$  de grasa dorsal) de indol, escatol y de la concentración suma de ambos compuestos (Indol+Escatol) en cerdos enteros y hembras según los grupos de concentración considerados. Análisis mediante HPLC-FN.

	BB <sup>1</sup>		BA <sup>1</sup>		MM <sup>1</sup>		AB <sup>1</sup>		AA <sup>1</sup>		HEMBRAS		Significación <sup>2</sup>
	X	ET	X	ET	X	ET	X	ET	X	ET	X	ET	
Indol	0,06 <sup>b</sup>	0,03	0,03 <sup>b</sup>	0,03	0,05 <sup>b</sup>	0,03	0,18 <sup>a</sup>	0,03	0,14 <sup>a</sup>	0,03	0,07 <sup>b</sup>	0,03	*
Escatol	0,06 <sup>b</sup>	0,03	0,01 <sup>b</sup>	0,03	0,05 <sup>b</sup>	0,03	0,24 <sup>a</sup>	0,03	0,29 <sup>a</sup>	0,03	0,07 <sup>b</sup>	0,03	***
Indol+Escatol	0,12 <sup>b</sup>	0,04	0,04 <sup>b</sup>	0,05	0,10 <sup>b</sup>	0,05	0,43 <sup>a</sup>	0,05	0,43 <sup>a</sup>	0,05	0,13 <sup>b</sup>	0,05	***

<sup>1</sup> Clasificación de las muestras según las concentraciones de escatol y androstenona determinadas mediante métodos rápidos. (BB) escatol bajo-androstenona baja; (BA) escatol bajo-androstenona alta; (MM) escatol medio-androstenona media; (AB) escatol alto-androstenona baja; (AA) escatol alto-androstenona alta

<sup>2</sup> Nivel de significación: \* (P< 0,05); \*\*\* (P<0,001)

**Tabla 3.16. Medias por mínimos cuadrados (X) y error típico (ET) de las concentraciones ( $\mu\text{g/g}$  de grasa dorsal) de indol, escatol y de la concentración suma de ambos compuestos (Indol+Escatol) en muestras de cerdos enteros y hembras clasificadas según la presencia o no de olor sexual. Análisis mediante HPLC-FN.**

	BT <sup>1</sup>		C <sup>1</sup>		Significación <sup>2</sup>
	X	ET	X	ET	
Indol	0,09	0,02	0,08	0,02	NS
Escatol	0,16 <sup>a</sup>	0,02	0,09 <sup>b</sup>	0,02	*
Indol+Escatol	0,25	0,03	0,17	0,03	NS

<sup>1</sup> Clasificación de las muestras de grasa según el análisis sensorial. (BT) muestras con olor sexual; (C) muestras control

<sup>2</sup> Nivel de significación: \* ( $P < 0,05$ ); NS: no significativa

Los valores medios de las concentraciones de indol, escatol y de la concentración suma de ambos compuestos (Tabla 3.17) no presentaron diferencias significativas entre las muestras procedentes de los distintos países europeos que participaron en el proyecto desarrollado (*AIR-UE Rationalisation and Harmonisation of the European Pig Market with Respect to the Production of Entire Male Pigs Through and Improved Knowledge of Compounds Responsible for Boar Odour*).

Las medias de la concentración de escatol y la concentración suma de indol y escatol de las muestras clasificadas con olor sexual mediante el análisis sensorial fueron superiores a la concentración media de las muestras control, excepto en el grupo de muestras con concentraciones bajas y medias de escatol (BB, BA y MM) y en las muestras procedentes de hembras (Tabla 3.18). La concentración media de escatol fue significativamente superior ( $P < 0,01$ ) en las muestras que presentaron concentraciones elevadas de escatol (AA y AB) y olor sexual respecto al resto de grupos evaluados. La media de la concentración suma de indol y escatol de las muestras clasificadas en el grupo AA y con olor sexual presentaron una concentración significativamente superior ( $P < 0,05$ ) al resto de grupos.

Las concentraciones medias, mínimas y máximas de escatol e indol en muestras de grasa dorsal porcina se presentan en la Tabla 3.20 según el país de producción de los animales

La frecuencia de distribución de las concentraciones de escatol e indol de las muestras de grasa dorsal de cerdo analizadas por HPLC-FN se presenta en la Tabla 3.21. Las concentraciones de escatol e indol fueron inferiores a  $0,10 \mu\text{g/g}$  en el 64,30% y 57,15% de los animales sacrificados, respectivamente. El 28,56% y el 11,90% de las canales presentaron una concentración de escatol e indol, respectivamente, superior a  $0,20 \mu\text{g/g}$ , mientras que el 7,14% y el 30,95% presentaron un intervalo de concentraciones de escatol e indol situado entre  $0,10$ - $0,20 \mu\text{g/g}$ . Las concentraciones de escatol e indol del grupo de muestras procedentes de hembras fueron inferiores a  $0,078 \mu\text{g/g}$  y  $0,092 \mu\text{g/g}$ , respectivamente.

Los porcentajes obtenidos variaron ligeramente al considerar la concentración suma de indol y escatol. Según este criterio, un 38,1% de las canales se clasificarían en el grupo de concentraciones bajas de escatol ( $< 0,10 \mu\text{g/g}$ ), un 21,4% presentarían una concentración intermedia ( $0,11$ - $0,21 \mu\text{g/g}$ ) y un 40,5% superaría la concentración límite de  $0,22 \mu\text{g/g}$ .

Tabla 3.17. Medias por mínimos cuadrados (X) y error típico (ET) de las concentraciones ( $\mu\text{g/g}$  de grasa dorsal) de indol, escatol y de la concentración suma de ambos compuestos (Indol+Escatol) en canales de cerdos enteros y hembras clasificadas según el país de procedencia. Análisis mediante HPLC-FN.

	DK <sup>1</sup>		ES <sup>1</sup>		FR <sup>1</sup>		UK <sup>1</sup>		NL <sup>1</sup>		SE <sup>1</sup>		Significación <sup>2</sup>
	X	ET	X	ET	X	ET	X	ET	X	ET	X	ET	
Indol	0,07	0,03	0,13	0,03	0,09	0,04	0,04	0,03	0,14	0,03	0,06	0,04	NS
Escatol	0,12	0,03	0,12	0,03	0,11	0,04	0,14	0,03	0,18	0,03	0,06	0,04	NS
Indol+Escatol	0,19	0,04	0,25	0,04	0,19	0,06	0,19	0,05	0,30	0,05	0,12	0,07	NS

<sup>1</sup> País de procedencia de las canales analizadas. (DK) Dinamarca; (ES) España; (FR) Francia; (UK) Reino Unido; (NL) Holanda; (SE) Suecia

<sup>2</sup> Nivel de significación: NS, no significativa

**Tabla 3.18. Interacción Grupo x Clase de las concentraciones (µg/g de grasa dorsal) de indol, escatol y de la concentración suma de ambos compuestos (Indol+Escatol) en cerdos enteros y hembras. Medias por mínimos cuadrados (X) y error típico (ET). Análisis mediante HPLC-FN.**

	Indol		Escatol <sup>1</sup>		Indol+Escatol <sup>1</sup>	
	X	ET	X	ET	X	ET
BB <sup>2</sup> xBT <sup>3</sup>	0,04	0,04	0,05 <sup>bc</sup>	0,04	0,11 <sup>ce</sup>	0,06
BB <sup>2</sup> xC <sup>3</sup>	0,06	0,04	0,08 <sup>bc</sup>	0,04	0,14 <sup>ce</sup>	0,06
BA <sup>2</sup> xBT <sup>3</sup>	0,01	0,04	0,02 <sup>c</sup>	0,04	0,04 <sup>e</sup>	0,06
BA <sup>2</sup> xC <sup>3</sup>	0,02	0,05	0,01 <sup>c</sup>	0,05	0,03 <sup>ce</sup>	0,07
MM <sup>2</sup> xBT <sup>3</sup>	0,05	0,04	0,06 <sup>bc</sup>	0,04	0,14 <sup>ce</sup>	0,06
MM <sup>2</sup> xC <sup>3</sup>	0,03	0,05	0,05 <sup>bc</sup>	0,05	0,06 <sup>ce</sup>	0,07
AB <sup>2</sup> xBT <sup>3</sup>	0,09	0,04	0,33 <sup>a</sup>	0,04	0,44 <sup>b</sup>	0,06
AB <sup>2</sup> xC <sup>3</sup>	0,29	0,05	0,16 <sup>b</sup>	0,05	0,43 <sup>bd</sup>	0,08
AA <sup>2</sup> xBT <sup>3</sup>	0,18	0,04	0,43 <sup>a</sup>	0,03	0,62 <sup>a</sup>	0,05
AA <sup>2</sup> xC <sup>3</sup>	0,09	0,05	0,15 <sup>b</sup>	0,05	0,23 <sup>cd</sup>	0,07
HEMBRASxBT <sup>3</sup>	0,03	0,05	0,06 <sup>bc</sup>	0,05	0,12 <sup>ce</sup>	0,07
HEMBRASxC <sup>3</sup>	0,05	0,05	0,08 <sup>bc</sup>	0,05	0,14 <sup>ce</sup>	0,08

<sup>1</sup> Nivel de significación: c oncentración de escatol (P<0,01), concentración suma de indol+escatol (P<0,05)

<sup>2</sup> Clasificación de las muestras de grasa según las concentraciones de escatol y androstenona determinadas mediante métodos rápidos. (BB) escatol bajo-androstenona baja; (BA) escatol bajo-androstenona alta; (MM) escatol medio-androstenona media; (AB) escatol alto-androstenona baja; (AA) escatol alto-androstenona alta

<sup>3</sup> Clasificación de las muestras de grasa según el análisis sensorial. (BT) muestras con olor sexual; (C) muestras control



**Tabla 3.19. Interacción País x Clase de las concentraciones ( $\mu\text{g/g}$  de grasa dorsal) de indol, escatol y de la concentración suma de ambos compuestos (Indol+Escatol) en cerdos enteros y hembras. Medias por mínimos cuadrados (X) y error típico (ET). Análisis mediante HPLC-FN.**

	Indol		Escatol		Indol+Escatol	
	X	ET	X	ET	X	ET
DK <sup>1</sup> xBT <sup>2</sup>	0,07	0,03	0,16	0,03	0,23	0,05
DK <sup>1</sup> xC <sup>2</sup>	0,09	0,05	0,07	0,05	0,16	0,08
ES <sup>1</sup> xBT <sup>2</sup>	0,16	0,03	0,15	0,03	0,31	0,05
ES <sup>1</sup> xC <sup>2</sup>	0,07	0,04	0,08	0,04	0,15	0,06
FR <sup>1</sup> xBT <sup>2</sup>	0,08	0,06	0,16	0,06	0,24	0,09
FR <sup>1</sup> xC <sup>2</sup>	0,09	0,05	0,09	0,06	0,18	0,09
UK <sup>1</sup> xBT <sup>2</sup>	0,06	0,03	0,17	0,03	0,23	0,05
UK <sup>1</sup> xC <sup>2</sup>	0,08	0,09	0,09	0,10	0,18	0,15
NL <sup>1</sup> xBT <sup>2</sup>	0,09	0,06	0,23	0,06	0,33	0,24
NL <sup>1</sup> xC <sup>2</sup>	0,13	0,04	0,12	0,04	0,24	0,06
SE <sup>1</sup> xBT <sup>2</sup>	0,06	0,08	0,04	0,09	0,02	0,13
SE <sup>1</sup> xC <sup>2</sup>	0,08	0,05	0,08	0,05	0,16	0,08

<sup>1</sup> País de procedencia de las canales analizadas. (DK) Dinamarca; (ES) España; (FR) Francia; (UK) Reino Unido; (NL) Holanda; (SE) Suecia

<sup>2</sup> Clasificación de las muestras de grasa según el análisis sensorial. (BT) muestras con olor sexual; (C) muestras control

Tabla 3.20. Concentraciones medias, mínimas y máximas de escatol e indol en muestras de grasa dorsal de cerdo entero ( $\mu\text{g/g}$ ). Análisis mediante HPLC-FN.

País	Escatol			Indol		
	Media	Mínima	Máxima	Media	Mínima	Máxima
FR (n=5)	0,04	0,02	0,06	0,09	0,03	0,15
SE (n=6)	0,13	0,01	0,34	0,09	0,02	0,22
ES (n=10)	0,17	0,03	0,57	0,03	0,03	0,32
DK (n=10)	0,10	0,01	0,45	0,07	0,01	0,19
UK (n=9)	0,12	0,01	0,53	0,04	0,01	0,09
NL (n=7)	0,24	0,04	0,60	0,17	0,02	0,58

DK: Dinamarca; ES: España; FR: Francia; UK: Reino Unido; NL: Holanda; SE: Suecia  
n, número de muestras analizadas

Tabla 3.21. Frecuencia de la distribución (%) de las concentraciones de escatol e indol en muestras de grasa dorsal de cerdo (n=42). Análisis mediante HPLC-FN.

Concentración ( $\mu\text{g/g}$ )	Escatol	Indol
$\leq 0,05$	35,73	35,72
0,05 – 0,10	28,57	21,43
0,10 – 0,20	7,14	30,95
0,20 – 0,30	11,90	7,14
0,30 – 0,40	7,14	2,38
0,40 – 0,50	2,38	-
$\geq 0,50$	7,14	2,38

Los cromatogramas de HPLC-FN y detección por fluorescencia correspondientes a los extractos de grasa dorsal de cerdos con concentraciones bajas, medias y altas de escatol se presentan en la Figura 3.20. Los resultados correspondientes a los extractos de grasa procedentes de canales de hembras según presentaran o no olor sexual se muestran en la Figura 3.21 y Figura 3.22, respectivamente. Las proporciones de los picos correspondientes al escatol e indol, respecto al del patrón interno, fueron superiores en las muestras de grasa que presentaron el defecto sensorial evaluado según los resultados del panel test.

Los cromatogramas correspondientes a muestras de grasa dorsal de cerdo entero clasificadas en el grupo de concentraciones de escatol inferiores a 0,10  $\mu\text{g/g}$ , según los resultados del método colorimétrico, se presentan en la Figura 3.23 y Figura 3.24. La altura del pico correspondiente al escatol, en comparación a la del 7etilindol, fue superior en las muestras que presentaron olor sexual (Tabla 3.16). La proporción del pico del indol no presentó diferencias significativas entre el grupo de muestras considerado.

El estudio del perfil de los cromatogramas correspondientes a las muestras de grasa con concentraciones bajas de escatol y androstenona (BB), independientemente de su valoración sensorial, mostró la elución de un pico de características más hidrofóbicas que los compuestos indólicos evaluados. La fracción, donde se eluyó este pico no identificado, se recogió y analizó mediante cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas. El análisis cromatográfico reveló la presencia de diferentes compuestos coeluidos junto al escatol e indol, que presentaron unos tiempos de retención superiores a los compuestos indólicos en las condiciones cromatográficas desarrolladas. En general, se observó la presencia de aldehidos (2,4-decadienal, 2,4-hexadienal), hidrocarburos (2-metil-1,5-hexadieno, 5-octadeceno) y ftalatos. El espectro de masas del pico mayoritario eluido a un tiempo de retención de 20,58 minutos presentó un fragmento mayoritario a  $m/z$  100. La búsqueda bibliográfica en la librería espectral no permitió establecer de forma concluyente la naturaleza química de esta sustancia. La comparación de los espectros indicó que se trataba posiblemente de un derivado de la morfolina o de la furaltadona.

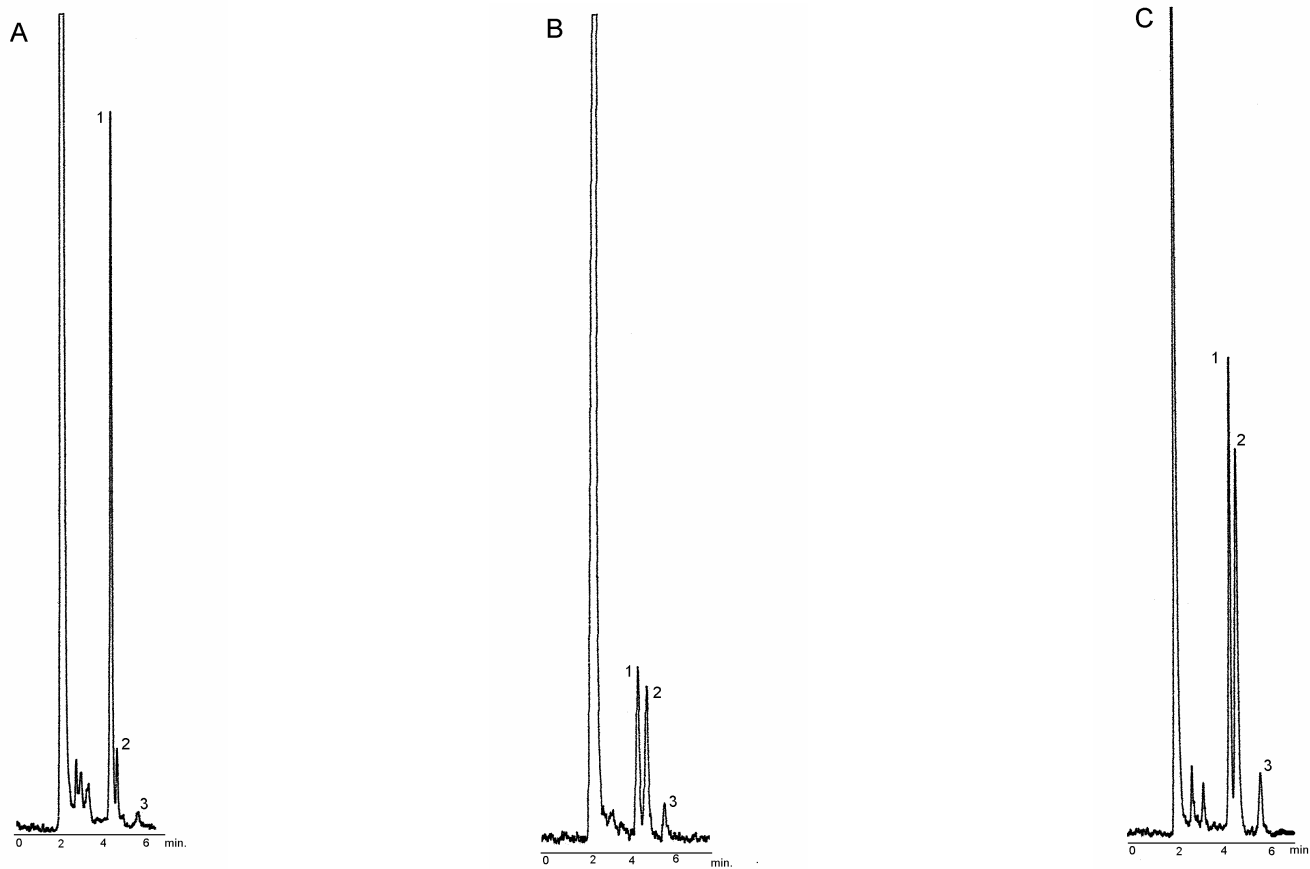


Figura 3.20. Cromatogramas de HPLC-FN y detección por fluorescencia ( $\lambda_{exc}=280$  nm y  $\lambda_{em}=360$  nm) de un extracto de grasa de cerdo con concentraciones de escatol: (A) bajas, (B) medias y (C) altas. Identificación de los picos: (1) 7-etilindol, (2) escatol y (3) indol

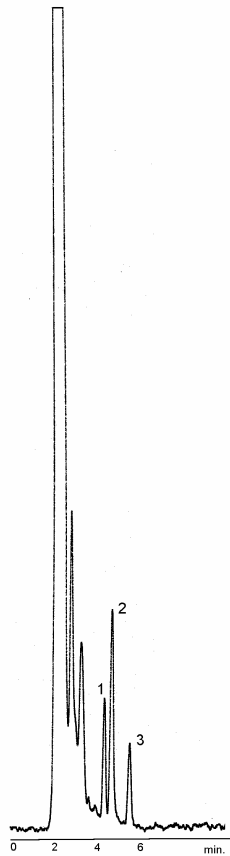


Figura 3.21. Cromatograma de HPLC-FN y detección por fluorescencia ( $\lambda_{exc}=280$  nm y  $\lambda_{em}=360$  nm) de un extracto de grasa dorsal de hembra clasificada con defecto sensorial. Identificación de los picos: (1) 7-etilindol, (2) escatol y (3) indol

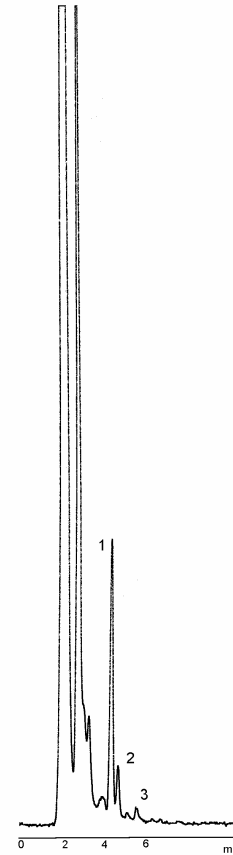


Figura 3.22. Cromatograma de HPLC-FN y detección por fluorescencia ( $\lambda_{exc}=280$  nm y  $\lambda_{em}=360$  nm) de un extracto de grasa dorsal de hembra clasificada sin defecto sensorial. Identificación de los picos: (1) 7-etilindol, (2) escatol y (3) indol

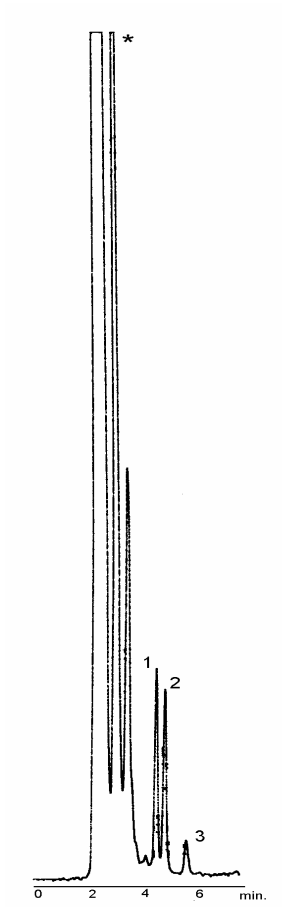


Figura 3.23. Cromatograma de HPLC-FN y detección por fluorescencia ( $\lambda_{exc}=280\text{ nm}$  y  $\lambda_{em}=360\text{ nm}$ ) de una muestra de grasa dorsal de cerdo con concentraciones bajas de escatol y olor sexual. Identificación de los picos: (1) 7-etilindol, (2) escatol, (3) indol y (\*) pico no identificado

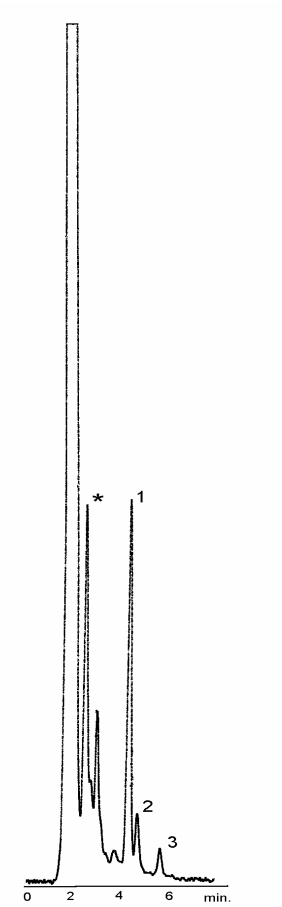


Figura 3.24. Cromatograma de HPLC-FN y detección por fluorescencia ( $\lambda_{exc}=280\text{ nm}$  y  $\lambda_{em}=360\text{ nm}$ ) de una muestra de grasa dorsal de cerdo con concentraciones bajas de escatol y sin olor sexual. Identificación de los picos: (1) 7-etilindol, (2) escatol, (3) indol y (\*) pico no identificado

Los resultados referentes a la concentración de escatol e indol de las muestras de grasa analizadas mediante el método cromatográfico desarrollado durante el presente trabajo de Tesis (HPLC-FN) se compararon con los resultados obtenidos mediante la aplicación del método colorimétrico (Hansen-Møller y Andersen, 1994) y del método de determinación por cromatografía líquida en fase reversa y detección por fluorescencia (Dehnhard y col., 1993). Los coeficientes de correlación de Pearson obtenidos en el intervalo de concentraciones de 0,02-0,80 equivalentes de escatol se presentan en la Tabla 3.22. Los equivalentes de escatol determinados espectrofotométricamente se correlacionaron significativamente ( $P < 0,001$ ) con las concentraciones de escatol e indol determinadas mediante HPLC-FN y HPLC-FR.

La limitación del intervalo de concentraciones de estudio entre 0,02-0,12 equivalentes de escatol disminuyó el nivel de significación del coeficiente de correlación entre los resultados de escatol obtenidos mediante el método de HPLC-FN y el método colorimétrico ( $P < 0,05$ ), mientras que las concentraciones de indol obtenidas mediante HPLC-FN no se correlacionaron significativamente con los resultados del método colorimétrico (Tabla 3.23).

La relación entre la concentración de escatol (Figura 3.25) y la concentración suma de indol y escatol (Figura 3.26) obtenidas por HPLC-FN y los equivalentes de escatol determinados mediante el método colorimétrico (Hansen-Møller y Andersen, 1994) se muestra gráficamente en el intervalo de concentraciones de (A) 0,02-0,80 equivalentes de escatol y (B) 0,02-0,12 equivalentes de escatol. La evaluación de las rectas de regresión obtenidas manifestó una mayor similitud entre los resultados de ambas metodologías cuando se consideró la concentración suma de indol y escatol ( $y = 1,101 x - 0,004$ , Figura 3.26). El descenso del valor de la pendiente obtenido al considerar la concentración de escatol ( $y = 0,755 x - 0,021$ , Figura 3.25) indicó que el método colorimétrico tiende a sobrestimar el contenido de escatol en grasa y, especialmente, cuando su concentración es baja, ya que las diferencias observadas fueron más acusadas cuando se redujo el intervalo de estudio a 0,02-0,12 equivalentes de escatol ( $y = 0,716 x + 0,029$  frente a  $y = 0,347 x + 0,014$ ).

Los resultados obtenidos en el análisis de componentes principales (PCA) al evaluar la concentración de escatol e indol determinada mediante el método colorimétrico (Hansen-Møller y Andersen, 1994), el método de HPLC-FR (Dehnhard y col., 1993) y el método de HPLC-FN desarrollado en el presente trabajo de Tesis se presentan en la Figura 3.27, donde se observa la correlación obtenida entre el análisis de indol y escatol de los diferentes métodos evaluados, de acuerdo con los resultados presentados en la Tabla 3.22.

La disposición de las muestras de grasa analizadas sobre los ejes manifestó que la variabilidad observada era debida mayoritariamente a las diferentes concentraciones de indol y escatol de las muestras evaluadas (83,34%). Las tres figuras presentadas comparan la clasificación de las muestras de grasa en las diferentes categorías de concentración de escatol (baja:  $\leq 0,10 \mu\text{g/g}$ , media  $0,11-0,21 \mu\text{g/g}$ , alta  $\geq 0,22 \mu\text{g/g}$ ), según si se consideraron los resultados obtenidos mediante la aplicación del método (A) colorimétrico, (B) desarrollado por HPLC-FN y detección por fluorescencia y (C) cuando se consideró la concentración suma de indol y escatol determinada mediante HPLC-FN.

Por otra parte, aproximadamente un 14,50% de las variaciones observadas en el eje del componente 2 se explican según la concentración de indol o escatol de las muestras de grasa analizadas.



Tabla 3.22. Coeficientes de correlación de *Pearson* entre las concentraciones de indol, escatol y la concentración suma de ambos compuestos (Indol+Escatol) en grasa dorsal de cerdos enteros y hembras determinadas mediante diferentes métodos analíticos. Intervalo de concentraciones para el escatol: 0,02-0,80 equivalentes de escatol.

	Escatol		Indol		Escatol + Indol		
	Colorimétrico <sup>1</sup>	HPLC-FR <sup>2</sup>	HPLC-FN	HPLC-FR <sup>2</sup>	HPLC-FN	HPLC-FR <sup>2</sup>	HPLC-FN
Escatol Colorimétrico <sup>1</sup>	1,000	0,927***	0,948***	0,711***	0,675***	0,975***	0,945***
Escatol HPLC-FR <sup>2</sup>		1,000	0,951***	0,452**	0,416**	0,893***	0,833***
Escatol HPLC-FN			1,000	0,558***	0,564***	0,913***	0,932***
Indol HPLC-FR <sup>2</sup>				1,000	0,954***	0,806***	0,801***
Indol HPLC-FN					1,000	0,664***	0,826***
Escatol+Indol HPLC-FR <sup>2</sup>						1,000	0,936***
Escatol+Indol HPLC-FN							1,000

<sup>1</sup>Método colorimétrico: Hansen-Møller y Andersen (1994); <sup>2</sup> Método HPLC-FR: Dehnhard y col. (1993)

Nivel de significación: \*\*\* (P<0,001); \*\* (P<0,01)

Tabla 3.23. Coeficientes de correlación de *Pearson* entre las concentraciones de indol, escatol y la concentración suma de ambos compuestos (Indol+Escatol) en grasa dorsal de cerdos enteros y hembras determinadas mediante diferentes métodos analíticos. Intervalo de concentraciones para el escatol: 0,02-0,12 equivalentes de escatol.

	Escatol		Indol		Escatol + Indol		
	Colorimétrico <sup>1</sup>	HPLC-FR <sup>2</sup>	HPLC-FN	HPLC-FR <sup>2</sup>	HPLC-FN	HPLC-FR <sup>2</sup>	HPLC-FN
Escatol Colorimétrico <sup>1</sup>	1,000	0,809***	0,444*	0,582***	0,384	0,765***	0,427*
Escatol HPLC-FR <sup>2</sup>		1,000	0,454*	0,671***	0,280	0,920***	0,372
Escatol HPLC-FN			1,000	0,327	0,834***	0,429*	0,945***
Indol HPLC-FR <sup>2</sup>				1,000	0,513*	0,908***	0,447*
Indol HPLC-FN					1,000	0,430*	0,966***
Escatol+Indol HPLC-FR <sup>2</sup>						1,000	0,447*
Escatol+Indol HPLC-FN							1,000

<sup>1</sup>Método colorimétrico: Hansen-Møller y Andersen (1994); <sup>2</sup> Método HPLC-FR: Dehnhard y col. (1993)

Nivel de significación: \*\*\* (P<0,001); \*\* (P<0,01); \* (P<0,05)

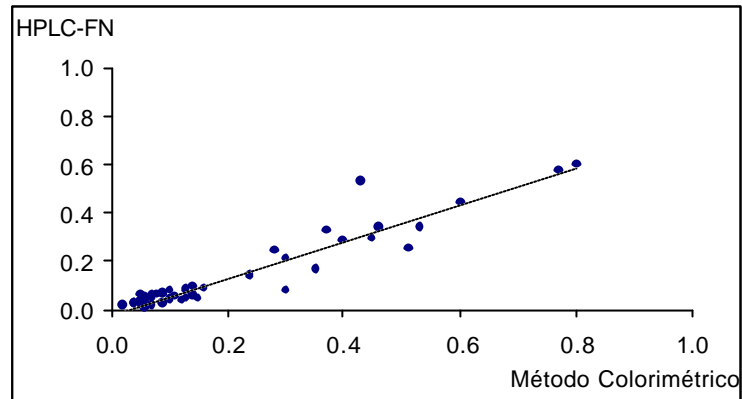
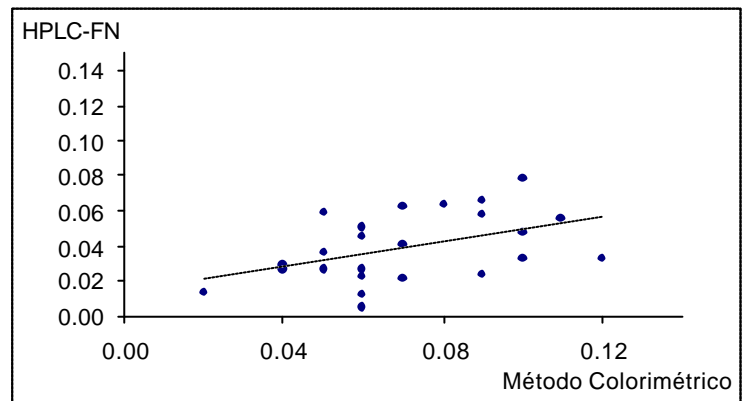
**A****B**

Figura 3.25. Relación entre la concentración de escatol ( $\mu\text{g/g}$  de grasa dorsal) determinada mediante el método colorimétrico (Hansen-Møller y Andersen, 1994) y el método de HPLC-FN desarrollado en este estudio según el intervalo de concentraciones de escatol considerado (A) 0,02-0,80 equivalentes de escatol ( $y = 0,755x - 0,021$ ,  $R^2 = 0,899$ ) y (B) 0,02-0,12 equivalentes de escatol ( $y = 0,347x + 0,014$ ,  $R^2 = 0,196$ )

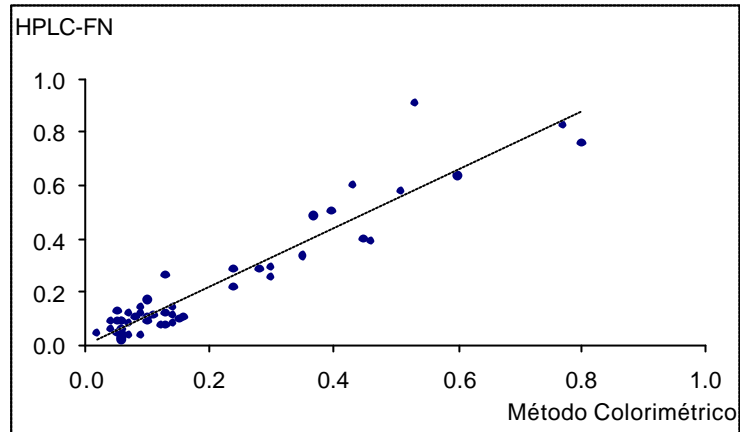
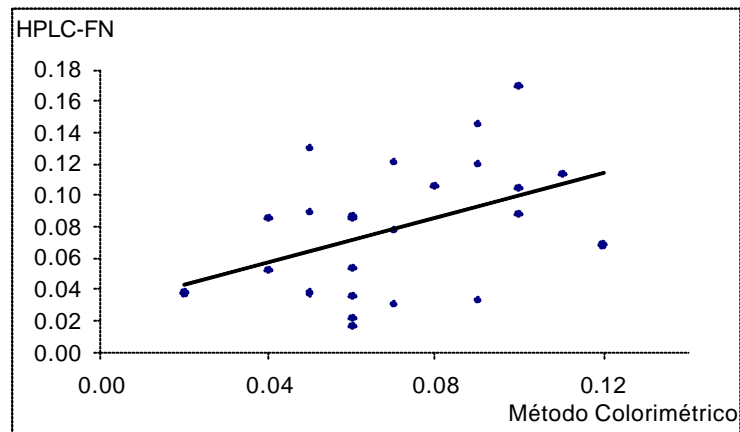
**A****B**

Figura 3.26. Relación entre la concentración de escatol ( $\mu\text{g/g}$  de grasa dorsal) determinada mediante el método colorimétrico (Hansen-Møller y Andersen, 1994) y la concentración suma de indol y escatol determinada mediante HPLC-FN según el intervalo de concentraciones de escatol considerado (A) 0,02-0,80 equivalentes de escatol ( $y = 1,101x - 0,004$ ,  $R^2 = 0,893$ ) y (B) 0,02-0,12 equivalentes de escatol ( $y = 0,716x + 0,029$ ,  $R^2 = 0,183$ )

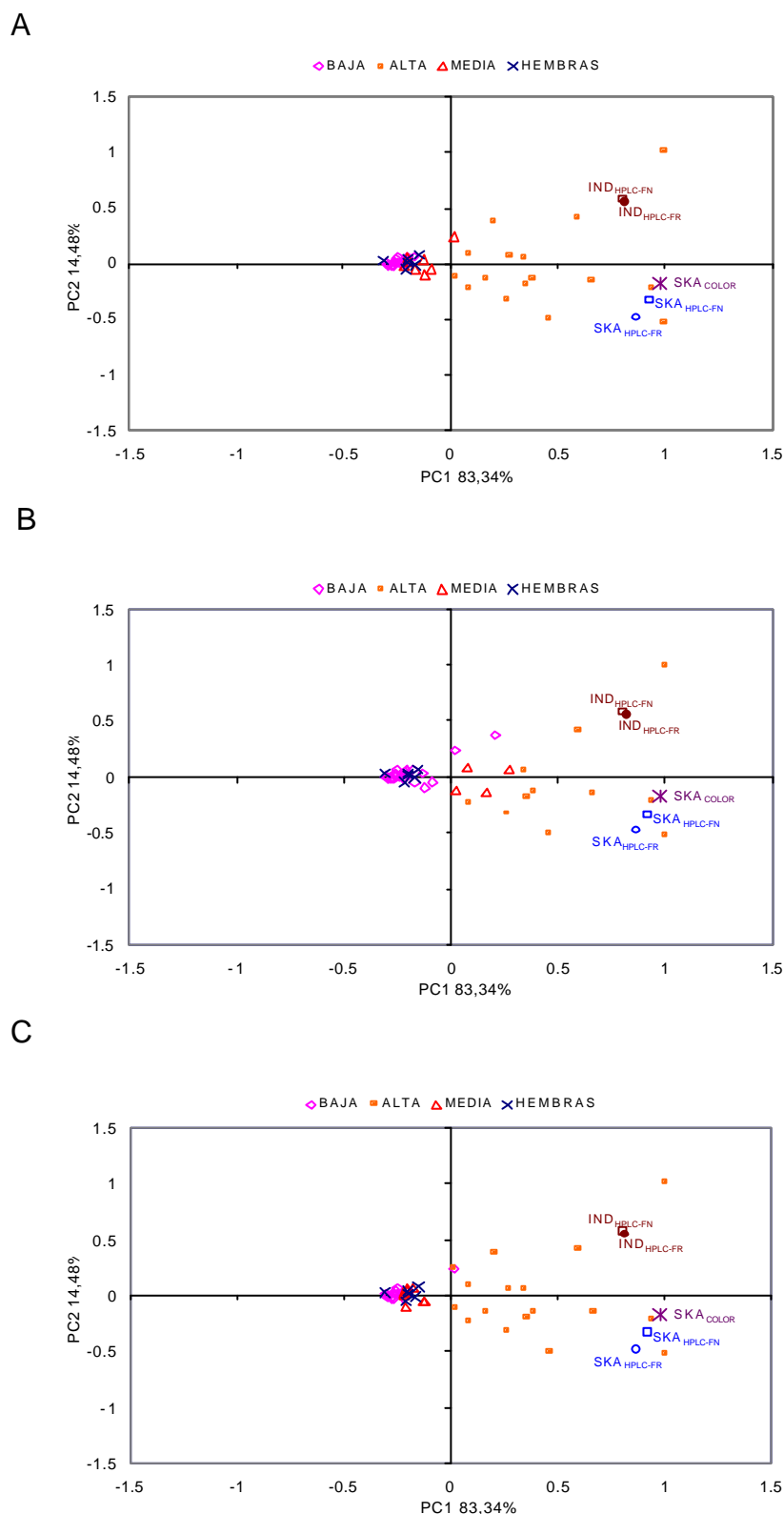


Figura 3.27. Análisis de componentes principales de las concentraciones de escatol e indol en muestras de grasa dorsal según los resultados de diferentes métodos analíticos (colorimétrico, HPLC-FN y HPLC-FR). Los símbolos representados indican la clasificación de las muestras determinada por los resultados del método (A) colorimétrico, (B) HPLC-FN desarrollado en este estudio y (C) considerando la concentración suma de indol y escatol determinada mediante HPLC-FN según los umbrales de concentración de escatol previamente establecidos: Baja ( $\leq 0,10$   $\mu\text{g/g}$ ), Media ( $0,11-0,21$   $\mu\text{g/g}$ ) y Alta ( $\geq 0,22$   $\mu\text{g/g}$ )

### 3.2.2. Determinación de androstenona y androstenoles en muestras de grasa dorsal procedentes de cerdos enteros y hembras mediante GC-MS

Los resultados correspondientes a las concentraciones medias de  $5\alpha$ -androsteron-16-en-3-ona,  $5\alpha$ -androsteron-16-en-3 $\alpha$ -ol,  $5\alpha$ -androsteron-16-en-3 $\beta$ -ol y a la concentración suma de ambos androstenoles en muestras de grasa dorsal de cerdos enteros y hembras mediante cromatografía en fase sólida y GC-MS se presentan en la Tabla 3.24, Tabla 3.25, Tabla 3.26, Tabla 3.27 y Tabla 3.28.

Las muestras de grasa clasificadas con concentraciones de androstenona elevadas (AA y BA) mediante el método ELISA (Claus y col., 1997a) y las clasificadas con olor sexual a partir de los resultados obtenidos mediante el análisis sensorial de un panel test especializado presentaron concentraciones de androstenona significativamente superiores al resto de los grupos ( $P < 0,001$ , Tabla 3.24) y clases evaluadas ( $P < 0,05$ , Tabla 3.25).

La concentración media de androstenona en el grupo de las hembras no presentó diferencias significativas en comparación al grupo de muestras clasificadas con concentraciones de androstenona bajas (BB) o medias (MM). No obstante, las muestras clasificadas con concentraciones altas de escatol y bajas de androstenona (AB) presentaron una concentración media de  $5\alpha$ -An significativamente distinta del grupo de las hembras (Tabla 3.24). Los valores medios de las concentraciones de androstenona,  $5\alpha$ -An-3 $\alpha$ -ol,  $5\alpha$ -An-3 $\beta$ -ol y la concentración suma de ambos androstenoles no presentaron diferencias significativas entre los países europeos participantes (Tabla 3.26).

Las medias de las concentraciones de  $5\alpha$ -An-3 $\alpha$ -ol,  $5\alpha$ -An-3 $\beta$ -ol y la concentración suma de ambos androstenoles fueron significativamente superiores en las muestras clasificadas con concentraciones elevadas de androstenona ( $P < 0,001$ , Tabla 3.24). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre la concentración de estos compuestos de muestras de grasa clasificadas con olor sexual y muestras que no presentaron defecto sensorial (Tabla 3.25).

Tabla 3.24. Medias por mínimos cuadrados (X) y error típico (ET) de las concentraciones ( $\mu\text{g/g}$  de grasa dorsal) de  $5\alpha\text{-An}$ ,  $5\alpha\text{-An-}3\alpha\text{-ol}$ ,  $5\alpha\text{-An-}3\beta\text{-ol}$  y de la concentración suma de los androstenoles ( $3\alpha\text{-ol}+3\beta\text{-ol}$ ) en cerdos enteros y hembras según los grupos de concentraciones considerados. Análisis mediante GC-MS.

	BB <sup>1</sup>		BA <sup>1</sup>		MM <sup>1</sup>		AB <sup>1</sup>		AA <sup>1</sup>		HEMBRAS		Significación <sup>2</sup>
	X	ET	X	ET	X	ET	X	ET	X	ET	X	ET	
$5\alpha\text{-An}$	0,12 <sup>bc</sup>	0,10	1,34 <sup>a</sup>	0,11	0,33 <sup>bc</sup>	0,11	0,46 <sup>b</sup>	0,13	1,12 <sup>a</sup>	0,12	0,01 <sup>c</sup>	0,13	***
$5\alpha\text{-An-}3\alpha\text{-ol}$	0,01 <sup>b</sup>	0,01	0,10 <sup>a</sup>	0,01	0,03 <sup>b</sup>	0,01	0,03 <sup>b</sup>	0,01	0,07 <sup>a</sup>	0,01	0,01 <sup>b</sup>	0,01	***
$5\alpha\text{-An-}3\beta\text{-ol}$	0,01 <sup>b</sup>	0,01	0,07 <sup>a</sup>	0,01	0,02 <sup>b</sup>	0,01	0,01 <sup>b</sup>	0,01	0,06 <sup>a</sup>	0,01	0,01 <sup>b</sup>	0,01	***
$3\alpha\text{-ol}+3\beta\text{-ol}$	0,03 <sup>b</sup>	0,02	0,17 <sup>a</sup>	0,02	0,05 <sup>b</sup>	0,02	0,04 <sup>b</sup>	0,02	0,12 <sup>a</sup>	0,02	0,02 <sup>b</sup>	0,02	***

$5\alpha\text{-An}$ :  $5\alpha\text{-androst-}16\text{-en-}3\text{-ona}$ ;  $5\alpha\text{-An-}3\alpha\text{-ol}$ :  $5\alpha\text{-androst-}16\text{-en-}3\alpha\text{-ol}$ ;  $5\alpha\text{-An-}3\beta\text{-ol}$ :  $5\alpha\text{-androst-}16\text{-en-}3\beta\text{-ol}$ ;  $3\alpha\text{-ol}+3\beta\text{-ol}$ :  $5\alpha\text{-androst-}16\text{-en-}3\alpha\text{-ol}+5\alpha\text{-androst-}16\text{-en-}3\beta\text{-ol}$

<sup>1</sup> Clasificación de las muestras según las concentraciones de escatol y androstenona determinadas mediante métodos rápidos. (BB) escatol bajo-androstenona baja; (BA) escatol bajo-androstenona alta; (MM) escatol medio-androstenona media; (AB) escatol alto-androstenona baja; (AA) escatol alto-androstenona alta

<sup>2</sup> Nivel de significación: \*\*\*( $P<0,001$ )

Tabla 3.25. Medias por mínimos cuadrados (X) y error típico (ET) de la concentración ( $\mu\text{g/g}$  de grasa dorsal) de  $5\alpha\text{-An}$ ,  $5\alpha\text{-An-}3\alpha\text{-ol}$ ,  $5\alpha\text{-An-}3\beta\text{-ol}$  y de la concentración suma de los androstenoles ( $3\alpha\text{-ol+}3\beta\text{-ol}$ ) en canales de cerdos enteros y hembras clasificadas según la presencia o ausencia de olor sexual. Análisis mediante GC-MS.

	BT <sup>1</sup>		C <sup>1</sup>		Significación <sup>2</sup>
	X	ET	X	ET	
$5\alpha\text{-An}$	0,68 <sup>a</sup>	0,07	0,44 <sup>b</sup>	0,07	*
$5\alpha\text{-An-}3\alpha\text{-ol}$	0,05	0,01	0,04	0,01	NS
$5\alpha\text{-An-}3\beta\text{-ol}$	0,03	0,01	0,03	0,01	NS
$3\alpha\text{-ol+}3\beta\text{-ol}$	0,07	0,01	0,07	0,01	NS

$5\alpha\text{-An}$ :  $5\alpha\text{-androst-}16\text{-en-}3\text{-ona}$ ;  $5\alpha\text{-An-}3\alpha\text{-ol}$ :  $5\alpha\text{-androst-}16\text{-en-}3\alpha\text{-ol}$ ;  $5\alpha\text{-An-}3\beta\text{-ol}$ :  $5\alpha\text{-androst-}16\text{-en-}3\beta\text{-ol}$ ;  $3\alpha\text{-ol+}3\beta\text{-ol}$ :  $5\alpha\text{-androst-}16\text{-en-}3\alpha\text{-ol+}5\alpha\text{-androst-}16\text{-en-}3\beta\text{-ol}$

<sup>1</sup> Clasificación de las muestras de grasa según el análisis sensorial. (BT) muestras con olor sexual; (C) muestras control

<sup>2</sup> Nivel de significación: \* ( $P < 0,05$ ); NS: no significativa



Tabla 3.26. Medias por mínimos cuadrados (X) y error típico de las concentraciones ( $\mu\text{g/g}$  de grasa dorsal) de  $5\alpha\text{-An}$ ,  $5\alpha\text{-An-}3\alpha\text{-ol}$ ,  $5\alpha\text{-An-}3\beta\text{-ol}$  y de la concentración suma de los androstenoles ( $3\alpha\text{-ol}+3\beta\text{-ol}$ ) en canales de cerdos enteros y hembras clasificadas según el país de procedencia. Análisis mediante GC-MS.

	DK <sup>1</sup>		ES <sup>1</sup>		FR <sup>1</sup>		UK <sup>1</sup>		NL <sup>1</sup>		SE <sup>1</sup>		Significación <sup>2</sup>
	X	ET	X	ET	X	ET	X	ET	X	ET	X	ET	
$5\alpha\text{-An}$	0,48	0,10	0,55	0,10	0,45	0,15	0,44	0,11	0,64	0,13	0,79	0,15	NS
$5\alpha\text{-An-}3\alpha\text{-ol}$	0,02	0,01	0,05	0,01	0,05	0,02	0,03	0,01	0,05	0,01	0,05	0,01	NS
$5\alpha\text{-An-}3\beta\text{-ol}$	0,02	0,01	0,04	0,01	0,03	0,01	0,04	0,01	0,03	0,01	0,03	0,01	NS
$3\alpha\text{-ol}+3\beta\text{-ol}$	0,04	0,02	0,09	0,01	0,07	0,02	0,07	0,02	0,07	0,02	0,08	0,03	NS

$5\alpha\text{-An}$ :  $5\alpha\text{-androst-}16\text{-en-}3\text{-ona}$ ;  $5\alpha\text{-An-}3\alpha\text{-ol}$ :  $5\alpha\text{-androst-}16\text{-en-}3\alpha\text{-ol}$ ;  $5\alpha\text{-An-}3\beta\text{-ol}$ :  $5\alpha\text{-androst-}16\text{-en-}3\beta\text{-ol}$ ;  $3\alpha\text{-ol}+3\beta\text{-ol}$ :  $5\alpha\text{-androst-}16\text{-en-}3\alpha\text{-ol}+5\alpha\text{-androst-}16\text{-en-}3\beta\text{-ol}$

<sup>1</sup> País de procedencia de las canales analizadas. (DK) Dinamarca; (ES) España; (FR) Francia; (UK) Reino Unido; (NL) Holanda; (SE) Suecia

<sup>2</sup> Nivel de significación. NS: no significativa

Las concentraciones medias de  $5\alpha$ -An- $3\beta$ -ol y la suma de  $5\alpha$ -An- $3\alpha$ -ol y  $5\alpha$ -An- $3\beta$ -ol de muestras clasificadas con olor sexual mediante el análisis sensorial fueron superiores ( $P < 0,05$ ) a las muestras control pertenecientes al grupo de concentraciones altas de escatol y androstenona (AA) (Tabla 3.27).

Los resultados de las concentraciones medias, mínimas y máximas de androstenona y androstenoles determinadas mediante GC-MS en muestras de grasa dorsal según el país de producción de los animales se muestran en la Tabla 3.29.

La frecuencia de distribución de la concentración de androstenona en las muestras de grasa dorsal de cerdo analizadas se presenta en la Tabla 3.30. La concentración de androstenona fue inferior a  $0,50 \mu\text{g/g}$  en el 54,76% de las canales analizadas. El 19% de los animales sacrificados presentaron una concentración de androstenona entre  $0,50$ - $1,0 \mu\text{g/g}$  y la concentración de  $5\alpha$ -An fue superior a  $1,0 \mu\text{g/g}$  en un 26,18% de las muestras analizadas. La concentración de androstenona en el grupo de las hembras analizadas fue inferior a  $0,17 \mu\text{g/g}$ .

Los cromatogramas de GC-MS correspondientes a muestras de grasa dorsal de cerdo entero con concentraciones bajas, medias y altas de androstenona obtenidos al seleccionar los fragmentos de  $m/z$  272 y  $m/z$  274 se presentan en la Figura 3.28. La abundancia relativa de los picos correspondientes a la androstenona y a los androstenoles fue superior en las muestras de grasa clasificadas con concentraciones elevadas de androstenona (Tabla 3.24).

**Tabla 3.27. Interacción Grupo x Clase de las concentraciones ( $\mu\text{g/g}$  de grasa dorsal) de 5 $\alpha$ -An, 5 $\alpha$ -An-3 $\alpha$ -ol, 5 $\alpha$ -An-3 $\beta$ -ol y de la concentración suma de los androstenoles (3 $\alpha$ -ol+3 $\beta$ -ol) en cerdos enteros y hembras. Medias por mínimos cuadrados (X) y error típico (ET). Análisis mediante GC-MS.**

	5 $\alpha$ -androst-16-en-3-ona		5 $\alpha$ -androst-16-en-3 $\alpha$ -ol		5 $\alpha$ -androst-16-en-3 $\beta$ -ol <sup>1</sup>		3 $\alpha$ -ol+3 $\beta$ -ol <sup>1</sup>	
	X	ET	X	ET	X	ET	X	ET
BB <sup>2</sup> xBT <sup>3</sup>	0,28	0,16	0,02	0,02	0,02 <sup>b</sup>	0,01	0,04 <sup>b</sup>	0,02
BB <sup>2</sup> xC <sup>3</sup>	0,15	0,16	0,01	0,02	0,01 <sup>b</sup>	0,01	0,01 <sup>b</sup>	0,02
BA <sup>2</sup> xBT <sup>3</sup>	1,70	0,15	0,09	0,02	0,06 <sup>ac</sup>	0,01	0,15 <sup>a</sup>	0,02
BA <sup>2</sup> xC <sup>3</sup>	0,72	0,19	0,10	0,02	0,08 <sup>a</sup>	0,01	0,19 <sup>a</sup>	0,03
MM <sup>2</sup> xBT <sup>3</sup>	0,45	0,15	0,03	0,01	0,02 <sup>b</sup>	0,01	0,04 <sup>b</sup>	0,02
MM <sup>2</sup> xC <sup>3</sup>	0,38	0,19	0,03	0,02	0,02 <sup>b</sup>	0,01	0,05 <sup>b</sup>	0,03
AB <sup>2</sup> xBT <sup>3</sup>	0,49	0,16	0,03	0,02	0,01 <sup>b</sup>	0,01	0,03 <sup>b</sup>	0,02
AB <sup>2</sup> xC <sup>3</sup>	0,53	0,20	0,03	0,02	0,02 <sup>b</sup>	0,01	0,05 <sup>b</sup>	0,03
AA <sup>2</sup> xBT <sup>3</sup>	1,26	0,14	0,09	0,01	0,08 <sup>a</sup>	0,01	0,17 <sup>a</sup>	0,02
AA <sup>2</sup> xC <sup>3</sup>	0,97	0,19	0,03	0,02	0,03 <sup>bc</sup>	0,01	0,06 <sup>b</sup>	0,03
HEMBRASxBT <sup>3</sup>	0,11	0,19	0,01	0,02	0,01 <sup>b</sup>	0,01	0,01 <sup>b</sup>	0,03
HEMBRASxC <sup>3</sup>	0,13	0,21	0,01	0,02	0,01 <sup>b</sup>	0,01	0,02 <sup>b</sup>	0,03

5 $\alpha$ -An: 5 $\alpha$ -androst-16-en-3-ona; 5 $\alpha$ -An-3 $\alpha$ -ol: 5 $\alpha$ -androst-16-en-3 $\alpha$ -ol; 5 $\alpha$ -An-3 $\beta$ -ol: 5 $\alpha$ -androst-16-en-3 $\beta$ -ol; 3 $\alpha$ -ol+3 $\beta$ -ol: 5 $\alpha$ -androst-16-en-3 $\alpha$ -ol+5 $\alpha$ -androst-16-en-3 $\beta$ -ol

<sup>1</sup> Nivel de significación: (P<0,05)

<sup>2</sup> Clasificación de las muestras según las concentraciones de escatol y androstenona determinadas mediante métodos rápidos. (BB) escatol bajo-androstenona baja; (BA) escatol bajo-androstenona alta; (MM) escatol medio-androstenona media; (AB) escatol alto-androstenona baja; (AA) escatol alto-androstenona alta

<sup>3</sup> Clasificación de las muestras de grasa según el análisis sensorial. (BT) muestras con olor sexual; (C) muestras control

**Tabla 3.28. Interacción País x Clase de las concentraciones ( $\mu\text{g/g}$  de grasa dorsal) de 5 $\alpha$ -androst-16-en-3-ona, 5 $\alpha$ -androst-16-en-3 $\alpha$ -ol, 5 $\alpha$ -androst-16-en-3 $\beta$ -ol y de la concentración suma de los androstenoles (3 $\alpha$ -ol+3 $\beta$ -ol) en cerdos enteros y hembras. Medias por mínimos cuadrados (X) y error típico (X). Análisis mediante GC-MS.**

	5 $\alpha$ -androst-16-en-3-ona		5 $\alpha$ -androst-16-en-3 $\alpha$ -ol		5 $\alpha$ -androst-16-en-3 $\beta$ -ol		3 $\alpha$ -ol+3 $\beta$ -ol	
	X	ET	X	ET	X	ET	X	ET
DK <sup>1</sup> xBT <sup>2</sup>	0,53	0,12	0,02	0,01	0,02	0,01	0,04	0,02
DK <sup>1</sup> xC <sup>2</sup>	0,34	0,18	0,03	0,02	0,02	0,01	0,05	0,03
ES <sup>1</sup> xBT <sup>2</sup>	0,71	0,12	0,06	0,01	0,05	0,01	0,10	0,02
ES <sup>1</sup> xC <sup>2</sup>	0,30	0,15	0,03	0,02	0,03	0,01	0,06	0,02
FR <sup>1</sup> xBT <sup>2</sup>	0,49	0,22	0,04	0,02	0,04	0,01	0,07	0,03
FR <sup>1</sup> xC <sup>2</sup>	0,50	0,20	0,04	0,02	0,03	0,02	0,07	0,03
UK <sup>1</sup> xBT <sup>2</sup>	0,58	0,11	0,04	0,01	0,02	0,01	0,08	0,02
UK <sup>1</sup> xC <sup>2</sup>	0,74	0,34	0,03	0,03	0,03	0,02	0,06	0,05
NL <sup>1</sup> xBT <sup>2</sup>	0,69	0,22	0,02	0,02	0,02	0,01	0,04	0,03
NL <sup>1</sup> xC <sup>2</sup>	0,60	0,15	0,05	0,01	0,04	0,01	0,09	0,02
SE <sup>1</sup> xBT <sup>2</sup>	1,29	0,32	0,07	0,03	0,04	0,02	0,11	0,05
SE <sup>1</sup> xC <sup>2</sup>	0,42	0,19	0,03	0,02	0,02	0,01	0,06	0,03

<sup>1</sup> País de procedencia de las canales analizadas. (DK) Dinamarca; (ES) España; (FR) Francia; (UK) Reino Unido; (NL) Holanda; (SE) Suecia

<sup>2</sup> Clasificación de las muestras de grasa según el análisis sensorial. (BT) muestras con olor sexual; (C) muestras control

Tabla 3.29. Concentraciones medias, mínimas y máximas de androstenona y androstenoles en muestras de grasa dorsal de cerdo entero ( $\mu\text{g/g}$ ). Análisis mediante GC-MS.

País	$5\alpha$ -androst-16-en-3-ona			$5\alpha$ -androst-16-en-3 $\alpha$ -ol			$5\alpha$ -androst-16-en-3 $\beta$ -ol		
	Media	Mínima	Máxima	Media	Mínima	Máxima	Media	Mínima	Máxima
FR (n=5)	0,27	0,04	0,84	0,04	0,01	0,11	0,02	0,01	0,08
SE (n=6)	0,43	0,04	1,84	0,18	0,01	0,56	0,12	0,01	0,36
ES (n=10)	0,67	0,05	2,31	0,05	0,01	0,17	0,05	0,01	0,16
DK (n=10)	0,61	0,09	1,75	0,02	0,01	0,08	0,02	0,01	0,05
UK (n=9)	0,58	0,01	1,83	0,05	0,01	0,10	0,04	0,01	0,08
NL (n=7)	0,78	0,24	1,21	0,05	0,01	0,11	0,04	0,01	0,09

DK: Dinamarca; ES: España; FR: Francia; UK: Reino Unido; NL: Holanda; SE: Suecia.

n: número de muestras analizadas

Tabla 3.30. Frecuencia de la distribución (%) de la concentración de androstenona ( $\mu\text{g/g}$ ) en muestras de grasa dorsal de cerdo entero. Análisis mediante GC-MS. (n=42 muestras).

Concentración ( $\mu\text{g/g}$ )	Androstenona
$\leq 0,10$	16,67
0,10 – 0,20	9,52
0,20 – 0,30	14,29
0,30– 0,40	9,52
0,40– 0,50	4,76
0,50 –1,0	19,06
1,0-1,50	11,90
1,50-2,0	9,52
$\geq 2,0$	4,76

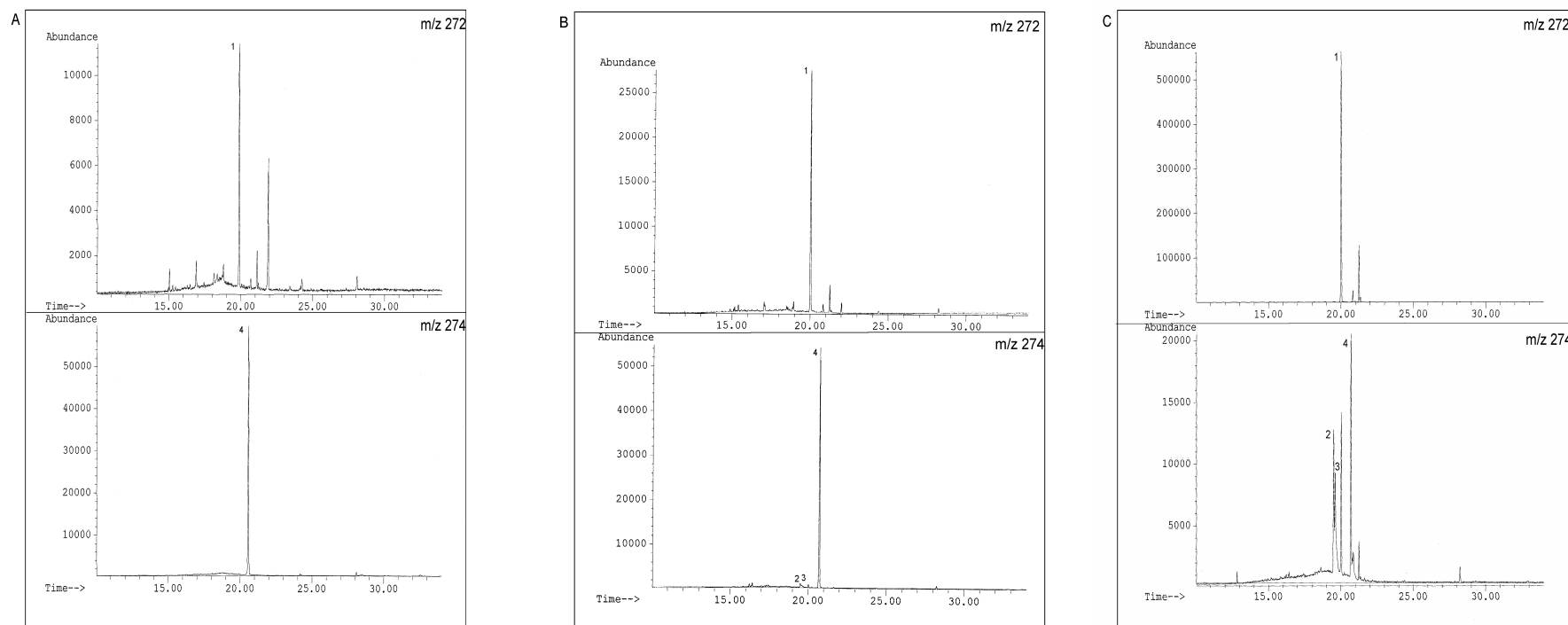


Figura 3.28. Cromatogramas de GC-MS en modo *TIC* de muestras de grasa dorsal de cerdos enteros con concentraciones de androstenona (A) bajas, (B) medias y (C) altas. Identificación de los picos: (1) 5 $\alpha$ -androst-16-en-3-ona, (2) 5 $\alpha$ -androst-16-en-3 $\alpha$ -ol, (3) 5 $\alpha$ -androst-16-en-3 $\beta$ -ol y (4) 5 $\alpha$ -androstan-3-ona (IS)

La concentración de androstenona determinada en este trabajo por GC-MS se comparó con los valores obtenidos mediante la aplicación de otras técnicas de análisis como el método ELISA (Claus y col., 1997a), el método colorimétrico (Squires y col., 1993) y el método por cromatografía líquida en fase reversa y detección por fluorescencia (Hansen-Møller, 1994). Los valores de los coeficientes de correlación de Pearson obtenidos en un intervalo de concentraciones de 0,01-3,5  $\mu\text{g/g}$  y 0,01-0,62  $\mu\text{g/g}$  de androstenona se presentan en la Tabla 3.31 y en la Tabla 3.32, respectivamente. Los resultados obtenidos mediante el método de cromatografía de gases se correlacionaron significativamente con los resultados obtenidos mediante ELISA ( $P < 0,001$ ) y el método de cromatografía líquida ( $P < 0,001$ ) en todo el intervalo de concentraciones de androstenona. La limitación del intervalo de concentraciones de androstenona entre 0,01-0,62  $\mu\text{g/g}$  determinó que las correlaciones entre el método colorimétrico y las metodologías cromatográficas no fueran significativas.

La representación gráfica de la concentración de androstenona determinada mediante el método ELISA versus los resultados obtenidos mediante el método de cromatografía de gases en el intervalo de concentraciones de 0,01-3,50  $\mu\text{g/g}$  (gráfica A) y 0,01-0,62  $\mu\text{g/g}$  (gráfica B) de androstenona se muestra en la Figura 3.29 y la representación gráfica de la concentración suma de androstenona y androstenoles obtenida mediante GC-MS versus la concentración de androstenona determinada por ELISA en el intervalo de concentraciones de 0,01-3,50  $\mu\text{g/g}$  (gráfica A) y 0,01-0,62  $\mu\text{g/g}$  se presenta en la Figura 3.30. La limitación del intervalo de concentraciones de androstenona no determinó diferencias sustanciales entre las rectas de regresión obtenidas.

El análisis de componentes principales de las concentraciones de androstenona y androstenoles en muestras de grasa dorsal determinadas mediante el método ELISA (Claus y col., 1997a), el método de HPLC-FR (Hansen-Møller, 1994), el método colorimétrico (Squires y col., 1993) y el método de GC-MS desarrollado durante el presente estudio se presenta en la Figura 3.31. La clasificación de las muestras en los diferentes grupos establecidos en función de la concentración de androstenona (baja  $\leq 0,50$   $\mu\text{g/g}$ , media 0,5-1,0  $\mu\text{g/g}$ , alta  $\geq 1,0$   $\mu\text{g/g}$ ) se realizó de acuerdo con los resultados obtenidos mediante (A) ELISA, (B) GC-MS y (C) considerando la concentración suma de androstenona y androstenoles determinada mediante GC-MS.

Las muestras de grasa se dispusieron sobre el eje del componente 1 (88,5%) en función de la concentración de androstenona y androstenoles, mientras que la variación observada en el eje del componente 2 (7,55%) permitió la diferenciación de las muestras según su contenido en androstenona o androstenoles. La correlación significativa observada previamente (Tabla 3.31) entre los métodos analíticos considerados explica su disposición en un único grupo en el eje de coordenadas.



Tabla 3.31. Coeficientes de correlación de *Pearson* entre la concentración de androstenona ( $\mu\text{g/g}$  de grasa dorsal) determinada mediante la aplicación de diversos métodos de análisis. Intervalo de concentraciones para la androstenona: 0,01-3,50  $\mu\text{g/g}$ .

	MÉTODOS ANALÍTICOS			
	COLORIMÉTRICO <sup>1</sup>	ELISA <sup>2</sup>	HPLC-FR <sup>3</sup>	GC-MS
COLORIMÉTRICO <sup>1</sup>	1,000	0,923***	0,934***	0,874***
ELISA <sup>2</sup>		1,000	0,985***	0,945***
HPLC-FR <sup>3</sup>			1,000	0,932***
GC-MS				1,000

Nivel de significación: \*\*\* (P<0,001)

<sup>1</sup> Método colorimétrico: Squires y col. (1993); <sup>2</sup> Método ELISA: Claus y col. (1997a); <sup>3</sup> Método HPLC-FR: Hansen-Møller (1994)

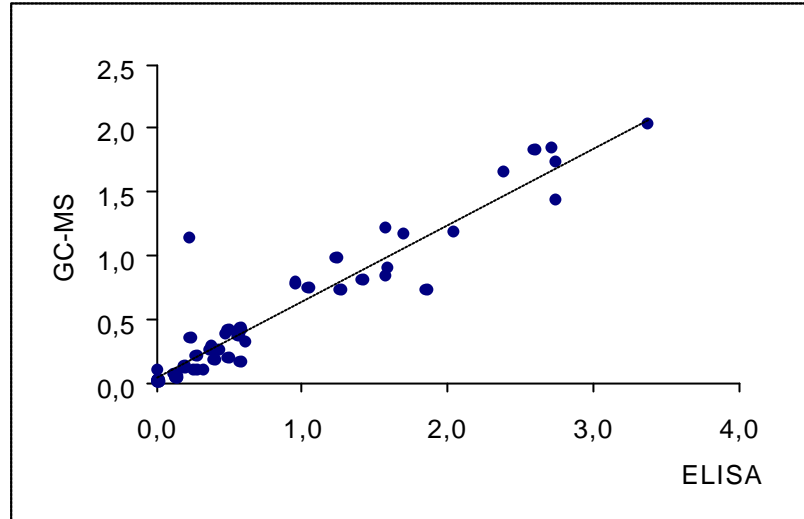
Tabla 3.32. Coeficientes de correlación de *Pearson* entre la concentración de androstenona ( $\mu\text{g/g}$  de grasa dorsal) determinada mediante la aplicación de diversos métodos de análisis. Intervalo de concentraciones para la androstenona 0,01-0,62  $\mu\text{g/g}$ .

	MÉTODOS ANALÍTICOS			
	COLORIMÉTRICO <sup>1</sup>	ELISA <sup>2</sup>	HPLC-FR <sup>3</sup>	GC-MS
COLORIMÉTRICO <sup>1</sup>	1,000	0,445*	0,350	0,221
ELISA <sup>2</sup>		1,000	0,922***	0,605***
HPLC-FR <sup>3</sup>			1,000	0,501**
GC-MS				1,000

Nivel de significación: \*\*\* (P<0,001); \*\* (P<0,01); \* (P<0,05)

<sup>1</sup> Método colorimétrico: Squires y col. (1993); <sup>2</sup> Método ELISA: Claus y col. (1997a); <sup>3</sup> Método HPLC-FR: Hansen-Møller (1994)

A



B

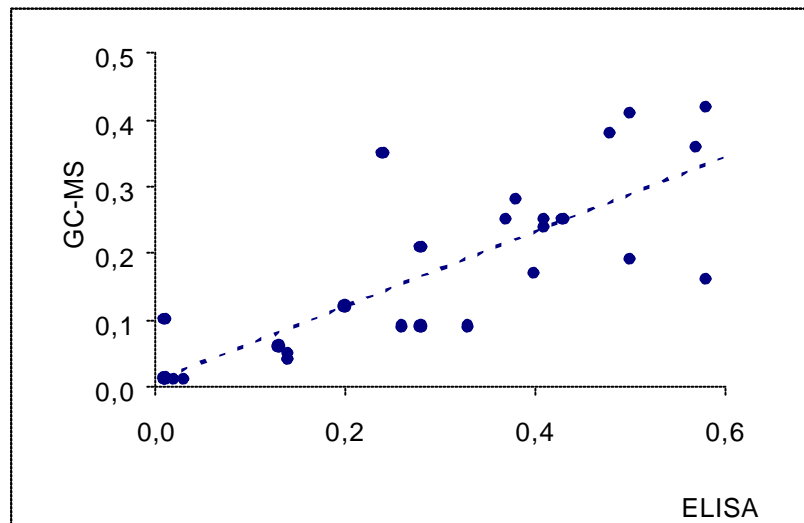
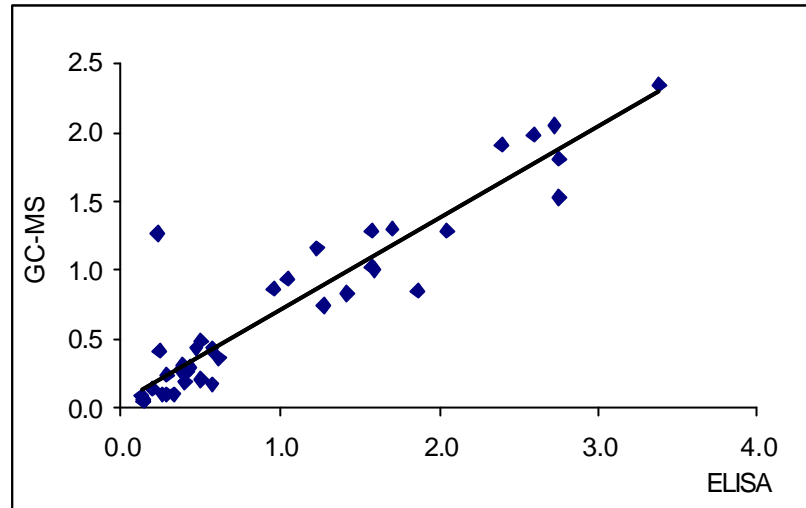


Figura 3.29. Relación entre la concentración de androstenona ( $\mu\text{g/g}$  de grasa dorsal) determinada mediante ELISA (Claus y col., 1997a) y GC-MS según el intervalo de concentraciones de androstenona considerado: (A) 0,01-3,50  $\mu\text{g/g}$  de androstenona ( $y= 0,603 x + 0,034$ ,  $R^2= 0,892$ ) y (B) 0,01-0,62  $\mu\text{g/g}$  de androstenona ( $y= 0,561 x + 0,008$ ,  $R^2=0,819$ )

A



B

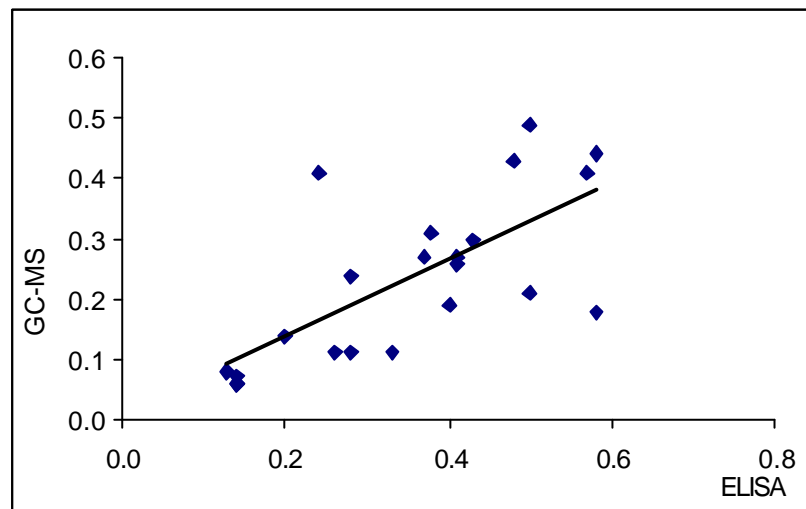


Figura 3.30. Relación entre la concentración de androstenona ( $\mu\text{g/g}$  de grasa dorsal) determinada mediante ELISA (Claus y col., 1997a) y la concentración suma de androstenona y androstenoles determinada por GC-MS según el intervalo de concentraciones de androstenona considerado: (A) 0,01-3,50  $\mu\text{g/g}$  de androstenona ( $y = 0,662x + 0,055$ ,  $R^2 = 0,872$ ) y (B) 0,01-0,62  $\mu\text{g/g}$  de androstenona ( $y = 0,646x + 0,006$ ,  $R^2 = 0,496$ )

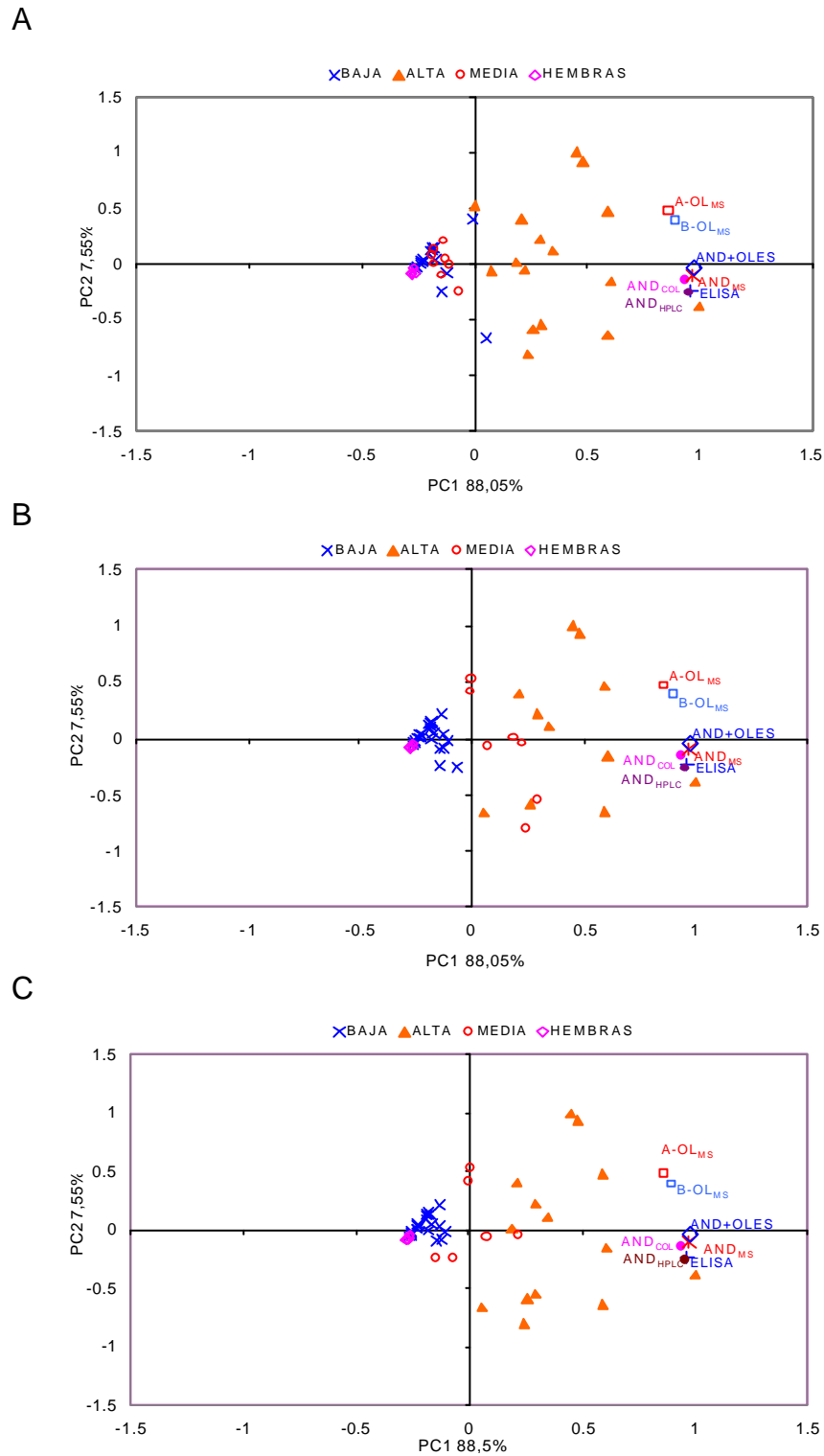


Figura 3.31. Análisis de componentes principales de la concentración de androstenona y androstenoles en muestras de grasa dorsal según los diferentes métodos analíticos (ELISA, colorimétrico, HPLC-FR y GC-MS). Los símbolos representados indican la clasificación de las muestras determinada por los resultados (A) del método ELISA, (B) del método de GC-MS desarrollado en este estudio y (C) considerando la concentración suma de androstenona y androstenoles determinada mediante GC-MS según los umbrales de concentración de androstenona previamente establecidos: Baja (≤ 0,50 µg/g), Media (0,5-1,0 µg/g) y Alta (≥ 1,0 µg/g)



Los coeficientes de correlación de Pearson correspondientes a las concentraciones de indol, escatol, androstenona y androstenoles determinadas en muestras de grasa dorsal por HPLC-FN y GC-MS, respectivamente, se presentan en la Tabla 3.33. La concentración de escatol se correlacionó significativamente con la concentración de indol ( $P < 0,001$ ) y la concentración suma de ambos compuestos ( $P < 0,001$ ), pero no se correlacionó con las concentraciones de androstenona o androstenoles. La concentración de androstenona en el tejido adiposo se correlacionó significativamente con las concentraciones de  $5\alpha$ -An- $3\alpha$ -ol y  $5\alpha$ -An- $3\beta$ -ol ( $P < 0,001$ ). Los coeficientes de correlación observados entre ambos androstenoles fueron altamente significativos ( $P < 0,001$ ).

El análisis de componentes principales correspondiente a la composición de las muestras de grasa dorsal en escatol, indol, androstenona y androstenoles determinada mediante los diferentes métodos analíticos evaluados: colorimétricos (Squires y col., 1993, Hansen-Møller y Andersen, 1994), ELISA (Claus y col., 1997a), HPLC-FR (Dehnhard y col., 1993, Hansen-Møller, 1994), HPLC-FN y GC-MS se presenta en la Figura 3.32. Las figuras presentadas comparan la clasificación de las muestras de grasa determinada por los resultados de (A) métodos rápidos -ELISA y espectrofotométrico-, (B) métodos cromatográficos desarrollados en el presente trabajo de Tesis -HPLC-FN y GC-MS- y (C) considerando las concentraciones suma de los compuestos indólicos y de los esteroides determinadas por HPLC-FN y GC-MS.

La disposición de las muestras de grasa analizadas sobre los ejes permitió su diferenciación en el eje del componente 1 (55,72%) según la concentración de los compuestos relacionados con el olor sexual y en el eje del componente 2 (29,18%) según la naturaleza del compuesto implicado (indol-escatol o androstenona-androstenoles). La correlación significativa (Tabla 3.33) previamente observada entre los métodos analíticos utilizados en la determinación de la androstenona y de los androstenoles explica su disposición en un único grupo. Los métodos utilizados para la determinación de los compuestos indólicos presentaron una distribución similar.

Los resultados del análisis de componentes principales obtenidos al descartar las muestras de grasa dorsal con concentraciones de androstenona y de escatol superiores a  $0,50 \mu\text{g/g}$  y  $0,15 \mu\text{g/g}$ , respectivamente, se presentan en la Figura 3.33. Las figuras presentadas comparan la clasificación de las muestras de grasa determinada por los resultados obtenidos mediante la aplicación de (A)

métodos rápidos y no específicos, (B) métodos cromatográficos (HPLC-FN y GC-MS) desarrollados en el presente trabajo de Tesis y (C) considerando las concentraciones suma de los compuestos indólicos y de los esteroides determinadas mediante HPLC-FN y GC-MS, respectivamente. La variación determinada en el eje del componente 1 (48,39%) explica la mayoría de diferencias observadas en las muestras de grasa analizadas según presentaran concentraciones elevadas de escatol-indol o androstenona-androstenoles, a diferencia de los resultados presentados en la Figura 3.32.

La clasificación de las muestras de grasa dorsal seleccionadas en el desarrollo del presente trabajo de Tesis se representan gráficamente en la Figura 3.34 según los umbrales de concentración establecidos para el escatol (bajo  $\leq 0,10$   $\mu\text{g/g}$ ; medio  $0,11-0,21$   $\mu\text{g/g}$  y alto  $\geq 0,22$   $\mu\text{g/g}$ ) y la androstenona (bajo  $\leq 0,50$   $\mu\text{g/g}$ ; medio  $0,50-1,0$   $\mu\text{g/g}$  y alto  $\geq 1,0$   $\mu\text{g/g}$ ) y de acuerdo a los resultados obtenidos mediante (A) métodos cromatográficos desarrollados en el presente estudio (HPLC-FN y GC-MS) y (B) método colorimétrico para el escatol (Hansen-Møller y Andersen, 1994) y método ELISA para la androstenona (Claus y col., 1997a).

La comparación entre ambas clasificaciones indicó que algunas muestras de grasa clasificadas en los grupos de concentraciones altas de androstenona (AA y BA) según los métodos rápidos presentaron concentraciones intermedias de este compuesto cuando se consideraron los resultados de los métodos específicos. Resultados similares se han observado al considerar el contenido de escatol de las muestras de grasa. El porcentaje de muestras de grasa con concentraciones bajas de androstenona y escatol fue superior cuando se consideraron los resultados de los métodos específicos.

Las diferencias descritas entre la clasificación de algunas muestras de grasa según los métodos cromatográficos y rápidos se minimizaron cuando se consideró la concentración suma del indol-escatol y de androstenona-androstenoles en la evaluación de los resultados obtenidos por HPLC-FN y GC-MS (Figura 3.35).

Tabla 3.33. Coeficientes de correlación de *Pearson* entre la concentración de indol, escatol, androstenona, androstenoles y la concentración suma de los compuestos indólicos (Indol+Escatol) y de los androstenoles (3 $\alpha$ -ol+3 $\beta$ -ol) en muestras de grasa dorsal de cerdo entero y hembras. Análisis mediante HPLC-FN y GC-MS.

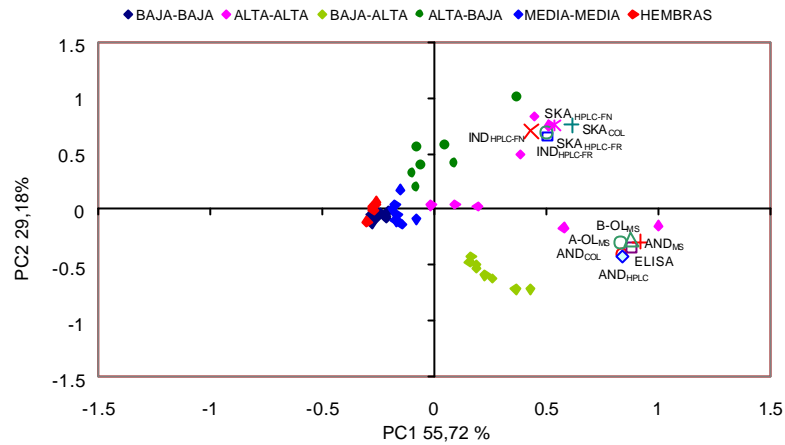
	Indol	Escatol	Indol+Escatol	5 $\alpha$ -An	5 $\alpha$ -An-3 $\alpha$ -ol	5 $\alpha$ -An-3 $\beta$ -ol	3 $\alpha$ -ol+3 $\beta$ -ol
Indol	1,000	0,568***	0,829***	0,206	0,206	0,205	0,211
Escatol		1,000	0,931***	0,248	0,218	0,263	0,236
Indol+Escatol			1,000	0,277	0,213	0,260	0,237
5 $\alpha$ -An				1,000	0,956***	0,939***	0,955***
5 $\alpha$ -An-3 $\alpha$ -ol					1,000	0,975***	0,996***
5 $\alpha$ -An-3 $\beta$ -ol						1,000	0,991***
3 $\alpha$ -ol+3 $\beta$ -ol							1,000

Nivel de significación: \*\*\* (P<0,001); \*\* (P<0,01)

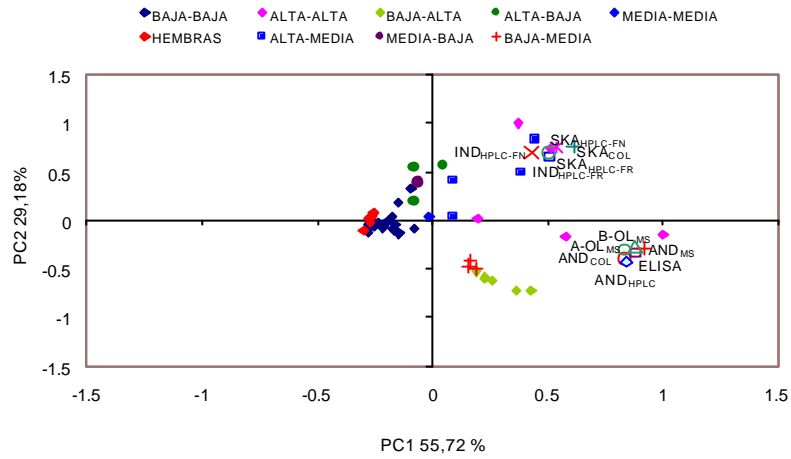
5 $\alpha$ -An: 5 $\alpha$ -androst-16-en-3-ona; 5 $\alpha$ -An-3 $\alpha$ -ol: 5 $\alpha$ -androst-16-en-3 $\alpha$ -ol; 5 $\alpha$ -An-3 $\beta$ -ol: 5 $\alpha$ -androst-16-en-3 $\beta$ -ol; 3 $\alpha$ -ol+3 $\beta$ -ol: 5 $\alpha$ -androst-16-en-3 $\alpha$ -ol+5 $\alpha$ -androst-16-en-3 $\beta$ -ol



A



B



C

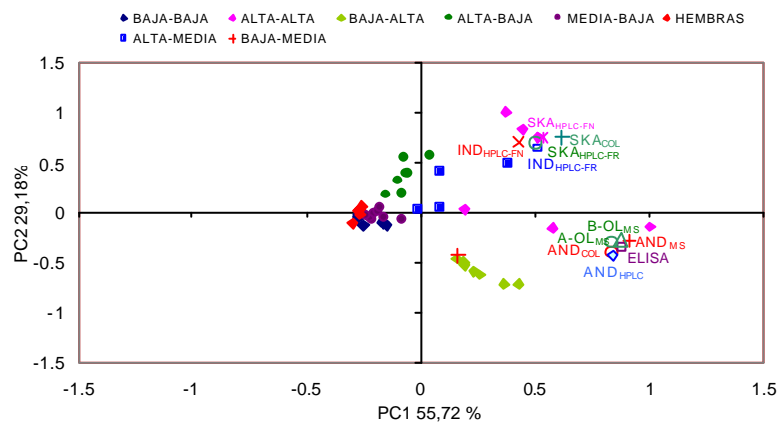
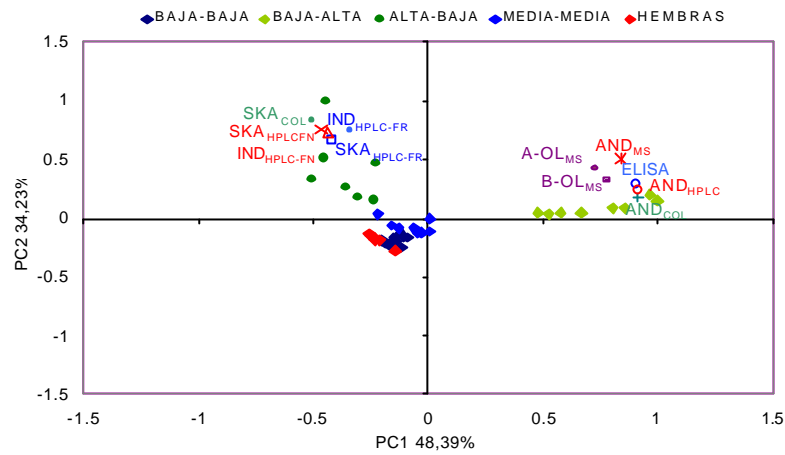
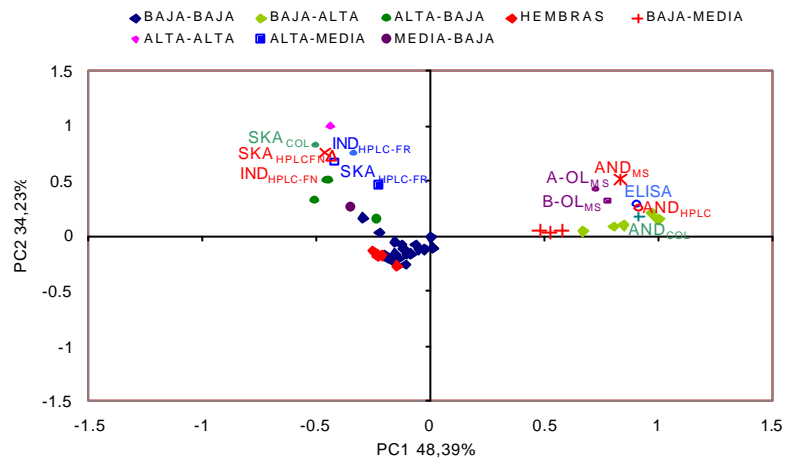


Figura 3.32. Análisis de componentes principales de la concentración de escatol, indol, androstenona y androstenoles en muestras de grasa dorsal según los resultados de diferentes métodos analíticos (colorimétricos, HPLC-FN, HPLC-FR, ELISA). Los símbolos representados indican la clasificación de las muestras, según los umbrales de concentración de escatol y androstenona previamente establecidos, determinada por los resultados de los (A) métodos rápidos, (B) métodos de HPLC-FN y GC-MS y (C) considerando la concentración suma de indol-escatol determinada por HPLC-FN y androstenona-androstenoles determinada por GC-MS

A



B



C

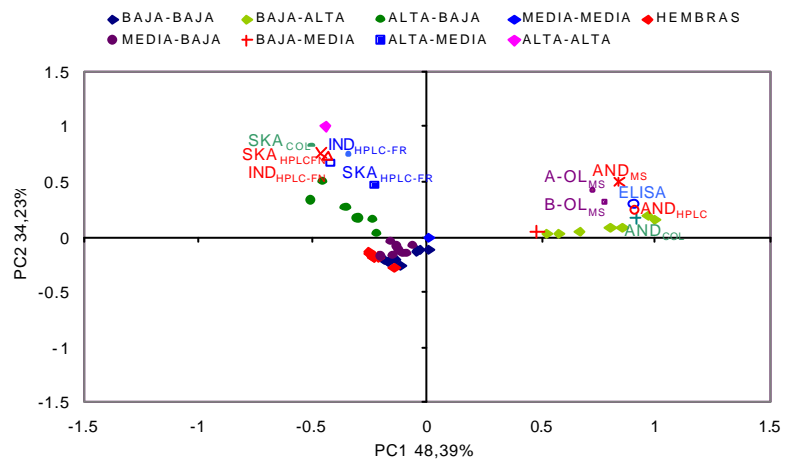


Figura 3.33. Análisis de componentes principales de la concentración de escatol, indol, androstenona y androstenoles en muestras de grasa dorsal de cerdos y hembras con concentraciones de escatol y androstenona inferiores a 0,15  $\mu\text{g/g}$  y 0,50  $\mu\text{g/g}$ . Los símbolos representados indican la clasificación de las muestras, según los umbrales de concentración de escatol y androstenona previamente establecidos, determinada por los resultados de los (A) métodos de rápidos, (B) métodos de HPLC-FN y GC-MS y (C) considerando la concentración suma de indol-escatol determinada por HPLC-FN y androstenona-androstenoles determinada por GC-MS

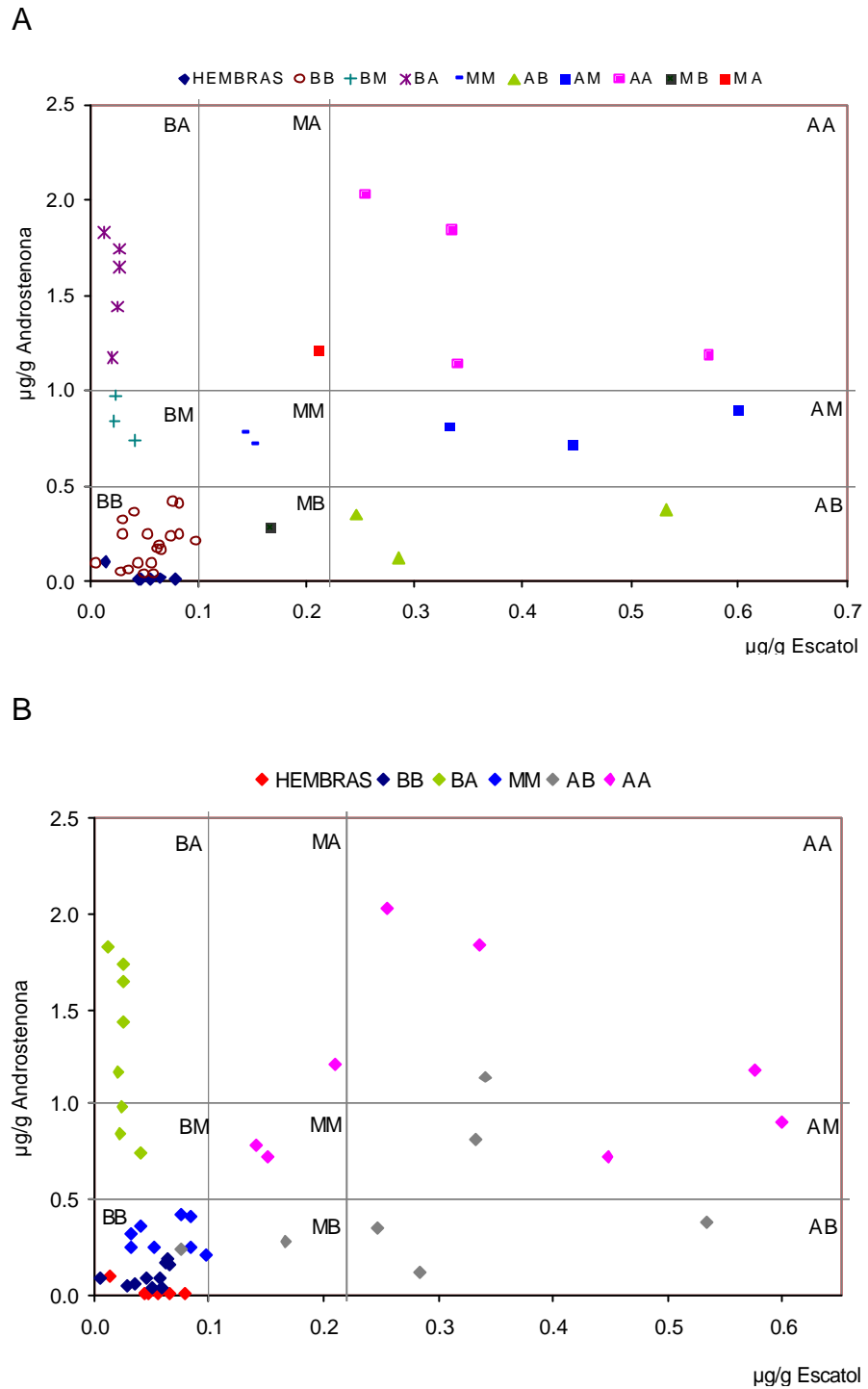


Figura 3.34. Distribución según la concentración de escatol y androstenona de las muestras de grasa dorsal de cerdo entero y hembras analizadas. Los símbolos representados indican la clasificación de las muestras, según los umbrales de concentración de escatol y androstenona previamente establecidos, determinada por los resultados de (A) métodos de HPLC-FN y GC-MS y (B) método colorimétrico para el escatol (Hansen-Møller y Andersen, 1994) y ELISA para la androstenona (Claus y col., 1997a)

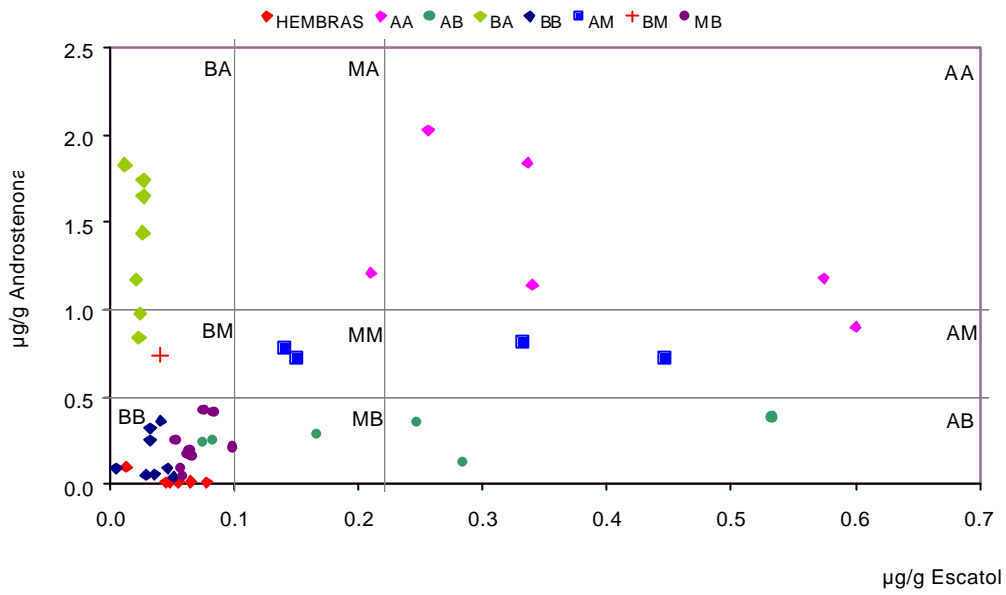


Figura 3.35. Distribución según la concentración de escatol y androstenona de las muestras de grasa dorsal de cerdos enteros y hembras analizadas. Los símbolos representados indican la clasificación de las muestras, según los umbrales de concentración de escatol y androstenona previamente establecidos, determinada por los resultados del método de HPLC-FN y GC-MS, considerando la concentración suma de escatol-indol y androstenona-androstenoles

### 3.3. Determinación del porcentaje de ácidos grasos totales en grasa dorsal de cerdos enteros y hembras mediante GC-FID

El paso previo a la determinación del porcentaje de los ácidos grasos totales es su extracción del tejido adiposo. El procedimiento empleado ha sido el descrito por Folch y col. (1957). La utilización de la mezcla de cloroformo:metanol (2:1), descrita en numerosos trabajos, permite la obtención de extractos que contienen la mayoría de los lípidos presentes en una muestra, tanto los lípidos neutros como los polares.

Los aspectos más importantes de la determinación de ácidos grasos son la saponificación, la formación y extracción de los ésteres metílicos y su separación cromatográfica. Los dos primeros puntos han sido ampliamente estudiados por diversos autores (Morrison y Smith, 1964; Christie, 1989; Díaz, 1993). La formación de los ésteres metílicos de los ácidos grasos es el aspecto más crítico y puede efectuarse por diferentes técnicas: HCl/MeOH, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, BF<sub>3</sub>/MeOH, BSTFA sin que exista un acuerdo unánime sobre su idoneidad. La derivatización de los ácidos grasos se efectuó mediante reacción con BF<sub>3</sub>/MeOH en el presente trabajo de Tesis, porque ofreció una mayor rapidez en la obtención de los ésteres y por la simplicidad de su posterior extracción en hexano.

El análisis cromatográfico se efectuó mediante GC con detector FID. La utilización de columnas capilares de fases polares (cianopropilmetilsilicona) estables térmicamente y enlazadas químicamente permitió la separación cromatográfica de los ácidos grasos en función del número de dobles enlaces, a diferencia de las columnas apolares que separan según el punto de ebullición de estos compuestos. Además, las columnas polares permiten la separación de los isómeros cis y trans de un mismo ácido graso y de las moléculas que difieren en la posición del doble enlace (C<sub>18</sub>:1 $\Delta$ 7, C<sub>18</sub>:1 $\Delta$ 9). El cromatograma de ácidos grasos totales correspondiente a una muestra de grasa dorsal de cerdo entero se presenta en la Figura 3.36.

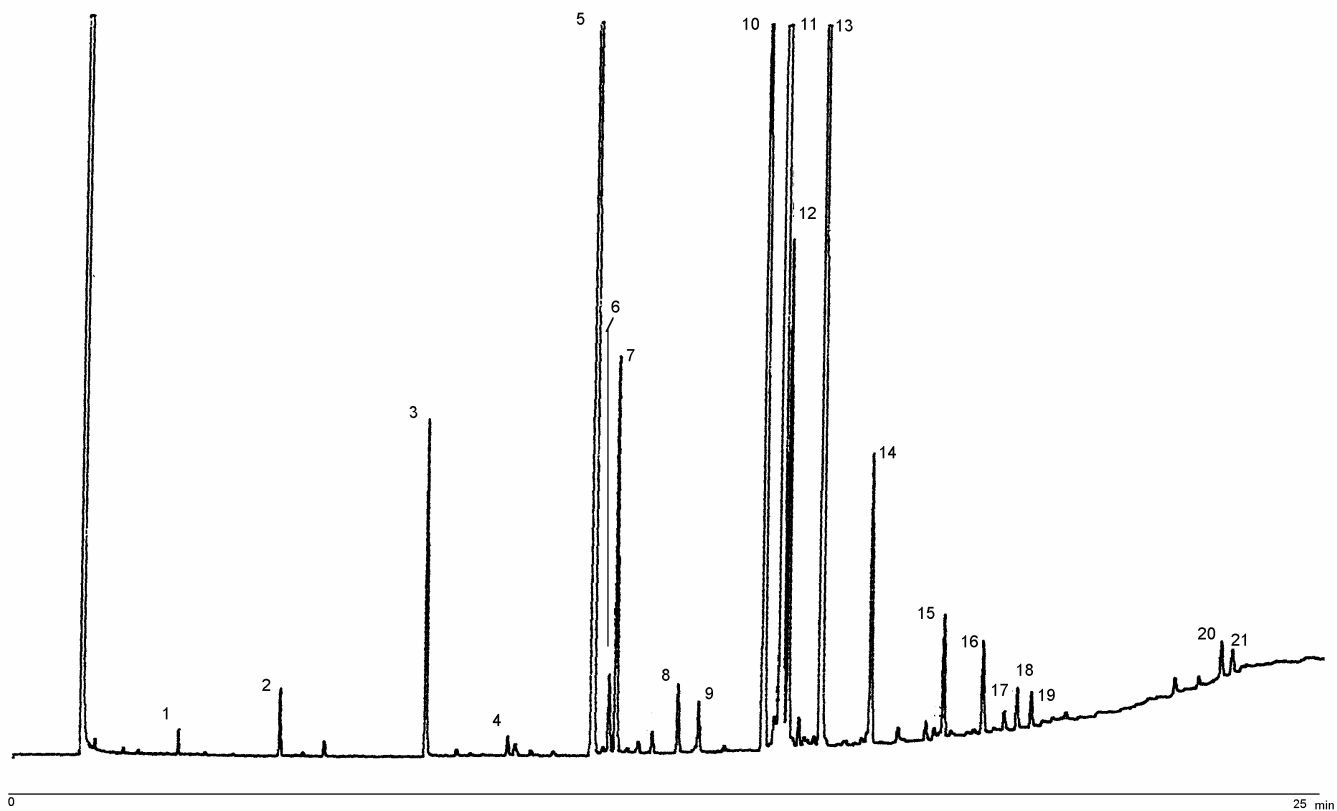


Figura 3..36. Cromatograma de ácidos grasos totales de grasa dorsal de cerdos enteros. Análisis mediante GC-FID. Identificación de los picos: 1, C10:0; 2, C12:0; 3, C14:0; 4, C15:0; 5, C16:0; 6, C16:1(n-11); 7, C16:1(n-9); 8, C17:0; 9, C17:1; 10, C18:0; 11, C18:1(n-9); 12, C18:1(n-7); 13, C18:2(n-6); 14, C18:3 $\alpha$ ; 15, C20:1; 16, C20:2; 17, C20:3 (n-6); 18, C20:4; 19, C20:3 (n-3); 20, C24:0; 21, C22:6(n-3)

El tratamiento estadístico de los resultados obtenidos mostró que el peso y porcentaje de magro de las canales, consideradas como covariables en el modelo estadístico del análisis de la varianza, no presentaron ningún efecto significativo en el porcentaje de los ácidos grasos considerados, a excepción del ácido esteárico ( $P < 0,05$ ). Los niveles de significación obtenidos en el análisis de la varianza se presentan en la Tabla 3.34.

La composición en ácidos grasos (porcentajes medios) de la grasa dorsal de cerdo se presenta en la Tabla 3.35 y Tabla 3.36 según los niveles de concentración de escatol y androstenona establecidos. El porcentaje medio del ácido decanoico fue significativamente superior ( $P < 0,001$ ) en las muestras de grasa con concentraciones medias de escatol y androstenona (MM), mientras el porcentaje de ácido mirístico fue significativamente inferior en el grupo de muestras de grasa procedentes de canales de hembras y comparable a las muestras de grasa clasificadas con concentraciones bajas de escatol y androstenona (BB) ( $P < 0,05$ ). La composición en ácido  $\gamma$ -linolénico (C18:3 $\gamma$ ) ( $P < 0,001$ ) y ácido esteárico (C18:0) ( $P < 0,01$ ) difirió significativamente entre las muestras clasificadas con concentraciones bajas de escatol y androstenona (BB) y las muestras procedentes de canales de hembras. La composición en ácido pentadecanoico fue significativamente superior ( $P < 0,001$ ) en las muestras con concentraciones bajas y medias de escatol y androstenona (BB y MM) y en las canales de hembras.

La suma de los porcentajes medios de los ácidos grasos saturados, insaturados y poliinsaturados y sus posibles relaciones se presenta en la Tabla 3.36. El grupo de muestras de grasa clasificadas con concentraciones bajas de escatol y androstenona (BB) presentó una composición en ácidos grasos saturados significativamente inferior ( $P < 0,05$ ) al resto de grupos considerados. Además, la relación entre el porcentaje suma de los ácidos grasos poliinsaturados y el porcentaje suma de los ácidos grasos saturados fue significativamente inferior ( $P < 0,05$ ) en las muestras de grasa procedentes de canales hembras y en las muestras clasificadas con concentraciones medias de escatol y androstenona (MM).

La composición en ácidos grasos del tejido adiposo no presentó notable diferencias según el país de procedencia de las canales analizadas (Tabla 3.37 y Tabla 3.38). Las muestras de grasa de cerdo procedentes de Holanda presentaron unos porcentajes medios de ácido dodecanoico ( $P < 0,001$ ), mirístico ( $P < 0,05$ ), 5,11,14-eicosatrienoico ( $P < 0,05$ ) y lignocérico ( $P < 0,01$ ) significativamente superiores al

resto de los países participantes, mientras que la composición en ácido lignocérico (C24:0) y ácido docosahexenoico (C22:6(n-3)) fue significativamente inferior ( $P < 0,01$ ) en las canales procedentes de Suecia. Además, las canales procedentes de España y Francia presentaron respectivamente una composición en ácido mirístico ( $P < 0,05$ ) y 5,11,14-eicosatrienoico ( $P < 0,05$ ) significativamente inferior.

Los porcentajes medios de ácido oleico (C18:1(n-9)) y de ácidos grasos insaturados fueron significativamente superiores en las muestras de grasa clasificadas con olor sexual según los resultados del panel test ( $P < 0,01$  y  $P < 0,05$ , Tabla 3.39), mientras los porcentajes medios de C22:6(n-3) ( $P < 0,05$ ) y la relación entre los porcentajes de ácidos grasos poliinsaturados y saturados ( $P < 0,05$ ) fueron significativamente superiores en las muestras control

Las muestras de grasa clasificadas sin olor sexual por los miembros de un panel test y con concentraciones bajas de escatol y androstenona (BB) y las procedentes de canales de hembras presentaron unos porcentajes medios de ácido lignocérico (C24:0) y ácido docosahexenoico (C22:6(n-3)) significativamente superiores a las muestras clasificadas con olor sexual y pertenecientes a los mismos grupos ( $P < 0,05$ , Tabla 3.40). Los porcentajes medios de estos compuestos no difirieron significativamente según la evaluación sensorial en el resto de grupos considerados.

El peso de sacrificio de los animales no se correlacionó con ningún ácido graso estudiado, a excepción del ácido dodecanoico (C12:0) ( $P < 0,05$ ) y del ácido docosahexenoico (C22:6(n-3)) ( $P < 0,01$ ). Los coeficientes de correlación de Pearson obtenidos entre los porcentajes de ácidos grasos totales determinados en grasa dorsal de cerdo se presentan en la Tabla 3.41. Los ácidos C16:0, C16:1(n-9), C18:1(n-7), C18:1(n-9), C18:2(n-6), C18:3 $\alpha$ (n-3) y C20:2 se correlacionaron significativamente entre sí, a excepción de los ácidos C16:0, C17:1 y C18:3 $\alpha$ (n-3) que no se correlacionaron respectivamente con los ácidos C18:1(n-7) y C18:1(n-9), C18:1(n-7) y C20:2. Los ácidos C18:0 y C20:0 se correlacionaron con los ácidos C16:0 y C18:3 $\alpha$ (n-3). Además, también se observó la correlación significativa del ácido C18:0 con los ácidos C12:0, C16:1(n-11) y C18:2(n-6) y del ácido C20:0 con el C20:3(n-3).

El ácido pentadecanoico se correlacionó con los ácidos C10:0, C17:0, C17:1, C18:3 $\gamma$ (n-3), C20:3(n-3), C20:3(n-6), C20:4 y C22:6(n-3). Los ácidos C17:0 y C20:4 se correlacionaron significativamente entre sí y además se correlacionaron con los ácidos C16:1(n-11), C16:1(n-9) y C17:1, a excepción del ácido C17:0 que no se



correlacionó con el C16:1(n-9). Sin embargo, el ácido margárico también se correlacionó con los ácidos C18:1(n-7), C18:3 $\gamma$ (n-3) y C22:6(n-3) y el ácido C20:4 con los ácidos C18:1(n-9) y C20:3(n-6).

El ácido C20:1 no se correlacionó significativamente con ningún ácido estudiado, mientras que los ácidos C24:0 y C22:6(n-3) se correlacionaron respectivamente con los ácidos  $\alpha$ -linolénico y heptadecenoico. Los ácidos dodecanoico y mirístico se correlacionaron entre sí y el ácido mirístico también se correlacionó negativamente con el ácido  $\gamma$ -linolénico. Por último, el ácido decanoico se correlacionó con los ácidos C16:0, C18:2(n-6), C18:3 $\alpha$ (n-3), C20:2 y C20:3(n-6) y, además, los ácidos C20:2 y C20:3(n-3) se correlacionaron respectivamente con los ácidos C24:0 y C22:6(n-3) y con los ácidos C12:0, C16:0, C16:1(n-9), C18:3 $\alpha$ (n-3), C20:3(n-6) y C24:0.

El porcentaje de los ácidos grasos poliinsaturados se correlacionó negativamente con los porcentajes de los ácidos grasos saturados e insaturados ( $P < 0,001$ ) y positivamente con las relaciones entre los porcentajes de ácidos grasos poliinsaturados y saturados y entre los porcentajes de los ácidos grasos poliinsaturados e insaturados ( $P < 0,001$ ) (Tabla 3.42). Los porcentajes de ácidos grasos saturados e insaturados se correlacionaron significativamente con las relaciones entre los porcentajes de ácidos grasos estudiadas. Además, estas relaciones se correlacionaron significativamente entre sí, a excepción del cociente entre los porcentajes de ácidos grasos saturados e insaturados y los porcentajes de ácidos grasos poliinsaturados y saturados.

Los androstenoles fueron los únicos compuestos implicados en el olor sexual que se correlacionaron con el porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados y con la relación entre los porcentajes de los ácidos grasos poliinsaturados e insaturados ( $P < 0,05$ , Tabla 3.42). Los porcentajes de los ácidos decanoico, pentadecanoico y C20:3(n-6) se correlacionaron negativamente con las concentraciones de escatol ( $P < 0,01$ ), androstenona ( $P < 0,001$ ) y androstenoles ( $P < 0,01$ ) (ver Tabla 3.43), mientras que la concentración de indol se correlacionó negativamente con el porcentaje de ácido decanoico ( $P < 0,05$ ). Además, la concentración de escatol se correlacionó significativamente con el porcentaje de C24:0 y C17:1 ( $P < 0,05$ ) y ambos androstenoles se correlacionaron positivamente con los porcentajes de C18:2(n-6) ( $P < 0,05$ ), C20:2 ( $P < 0,01$ ) y negativamente con el porcentaje de C20:4 ( $P < 0,05$ ). El ácido heptadecenoico se correlacionó también con el 5 $\alpha$ -An-3 $\alpha$ -ol.

Tabla 3.34. Composición (%) en ácidos grasos totales de la grasa dorsal de cerdos y hembras. Análisis de la varianza. Significaciones. Análisis mediante GC-FID.

	GRUPO <sup>1</sup>	PAIS <sup>2</sup>	CLASE <sup>3</sup>	GRUPO <sup>1</sup> xCLASE <sup>3</sup>	PAIS <sup>2</sup> xCLASE <sup>3</sup>
C10:0	***	NS	NS	NS	NS
C12:0	NS	***	NS	NS	NS
C14:0	*	*	NS	NS	NS
C15:0	***	NS	NS	NS	NS
C16:0	NS	NS	NS	NS	NS
C16:1(n-11)	NS	NS	NS	NS	NS
C16:1(n-9)	NS	NS	NS	NS	NS
C17:0	NS	NS	NS	NS	NS
C17:1	NS	NS	NS	NS	NS
C18:0	**	NS	NS	NS	NS
C18:1(n-7)	NS	NS	NS	NS	NS
C18:1(n-9)	NS	NS	**	NS	NS
C18:2(n-6)	NS	NS	NS	NS	NS
C18:3γ (n-6)	***	NS	NS	NS	NS
C18:3α (n-3)	NS	NS	NS	NS	NS
C20:0	***	NS	NS	NS	NS
C20:1	NS	NS	NS	NS	NS
C20:2	NS	NS	NS	NS	NS
C20:3(n-6)	***	*	NS	NS	NS
C20:4	NS	NS	NS	NS	NS
C20:3(n-3)	NS	NS	NS	NS	NS
C24:0	NS	**	NS	*	NS
C22:6 (n-3)	NS	**	*	*	NS
Σ SAT <sup>4</sup>	*	NS	NS	NS	NS
Σ INSAT <sup>5</sup>	NS	NS	*	NS	NS
Σ POLISAT <sup>6</sup>	NS	NS	NS	NS	NS
Σ POLISAT/Σ SAT <sup>7</sup>	*	NS	NS	NS	NS
Σ POLISAT/Σ INSAT <sup>8</sup>	NS	NS	*	NS	NS
Σ SAT/Σ INSAT <sup>9</sup>	NS	NS	NS	NS	NS

<sup>1</sup> Clasificación de las muestras de grasa según las concentraciones de escatol y androstenona determinadas mediante métodos rápidos. (BB) escatol bajo-androstenona baja; (BA) escatol bajo-androstenona alta; (MM) escatol medio:androstenona media; (AB) escatol alto-androstenona baja; (AA) escatol alto-androstenona alta

<sup>2</sup> País de procedencia de las canales analizadas. (DK) Dinamarca; (ES) España; (FR) Francia; (UK) Reino Unido; (NL) Holanda; (SE) Suecia

<sup>3</sup> Clasificación de las muestras de grasa según el análisis sensorial. (BT) muestras con olor sexual; (C) muestras control

ΣSAT<sup>4</sup>: porcentaje suma de los ácidos grasos saturados; ΣINSAT<sup>5</sup>: porcentaje suma de los ácidos grasos insaturados; ΣPOLISAT<sup>6</sup>: porcentaje suma de los ácidos grasos poliinsaturados; ΣPOLISAT/ΣSAT<sup>7</sup>: relación entre los porcentajes suma de los ácidos grasos poliinsaturados y saturados; ΣPOLISAT/ΣINSAT<sup>8</sup>: relación entre los porcentajes suma de los ácidos grasos poliinsaturados e insaturados; ΣSAT/ΣINSAT<sup>9</sup>: relación entre los porcentajes suma de los ácidos grasos saturados e insaturados

Nivel de significación: \*\*\* (P<0,001); \*\* (P<0,01); \* (P<0,05)

Tabla 3.35. Composición en ácidos grasos totales (%) de la grasa dorsal de cerdos enteros y hembras según los grupos de concentración de escatol y androstenona considerados. Medias por mínimos cuadrados (X) y error típico (ET). Análisis mediante GC-FID.

	BB <sup>1</sup>		BA <sup>1</sup>		MM <sup>1</sup>		AB <sup>1</sup>		AA <sup>1</sup>		HEMBRAS	
	X	ET	X	ET	X	ET	X	ET	X	ET	X	ET
C10:0	0,05 <sup>b</sup>	0,01	0,03 <sup>c</sup>	0,01	0,10 <sup>a</sup>	0,01	0,03 <sup>c</sup>	0,01	0,04 <sup>c</sup>	0,01	0,07 <sup>b</sup>	0,01
C12:0	0,15	0,01	0,12	0,02	0,15	0,02	0,11	0,02	0,11	0,02	0,13	0,02
C14:0	1,54 <sup>ab</sup>	0,06	1,64 <sup>a</sup>	0,07	1,62 <sup>a</sup>	0,07	1,63 <sup>a</sup>	0,08	1,68 <sup>a</sup>	0,07	1,34 <sup>b</sup>	0,08
C15:0	0,11 <sup>a</sup>	0,01	0,05 <sup>b</sup>	0,02	0,11 <sup>a</sup>	0,02	0,03 <sup>b</sup>	0,02	0,02 <sup>b</sup>	0,02	0,11 <sup>a</sup>	0,02
C16:0	20,07	0,50	21,48	0,55	21,84	0,55	21,14	0,63	21,63	0,54	22,30	0,64
C16:1(n-11)	0,57	0,03	0,52	0,03	0,49	0,03	0,55	0,04	0,53	0,03	0,42	0,04
C16:1(n-9)	2,69	0,19	2,41	0,21	2,65	0,21	2,65	0,24	2,68	0,20	2,53	0,24
C17:0	0,49	0,05	0,49	0,06	0,52	0,06	0,50	0,06	0,44	0,05	0,57	0,06
C17:1	0,50	0,05	0,43	0,05	0,47	0,05	0,40	0,06	0,40	0,05	0,53	0,06
C18:0	9,45 <sup>c</sup>	0,44	11,39 <sup>ab</sup>	0,48	11,20 <sup>ab</sup>	0,48	10,49 <sup>bc</sup>	0,55	10,86 <sup>ab</sup>	0,47	12,15 <sup>a</sup>	0,56
C18:1(n-7)	3,15	0,12	2,84	0,13	3,09	0,13	2,91	0,15	3,14	0,13	3,14	0,15
C18:1(n-9)	38,91	0,79	36,71	0,87	38,58	0,87	36,59	0,99	37,39	0,85	38,88	1,02
C18:2(n-6)	16,62	0,99	18,12	1,09	15,20	1,08	18,38	1,24	17,20	1,07	13,69	1,27
C18:3 $\gamma$	0,04 <sup>b</sup>	0,01	0,03 <sup>b</sup>	0,01	0,03 <sup>b</sup>	0,01	0,03 <sup>b</sup>	0,01	0,03 <sup>b</sup>	0,01	0,07 <sup>a</sup>	0,01
C18:3 $\alpha$	1,77	0,19	1,70	0,21	1,37	0,21	2,06	0,24	1,71	0,21	1,15	0,24

<sup>1</sup> Clasificación de las muestras de grasa según las concentraciones de escatol y androstenona determinadas mediante métodos rápidos. (BB) escatol bajo-androstenona baja; (BA) escatol bajo-androstenona alta; (MM) escatol medio:androstenona media; (AB) escatol alto-androstenona baja; (AA) escatol alto-androstenona alta

Tabla 3.36. Composición en ácidos grasos totales (%) de la grasa dorsal de cerdos enteros y hembras según los grupos de concentración de escatol y androstenona considerados. Medias por mínimos cuadrados (X) y error típico (ET). Análisis mediante GC-FID.

	BB <sup>1</sup>		BA <sup>1</sup>		MM <sup>1</sup>		AB <sup>1</sup>		AA <sup>1</sup>		HEMBRAS	
	X	ET	X	ET	X	ET	X	ET	X	ET	X	ET
C20:0	0,21 <sup>a</sup>	0,03	0,07 <sup>bc</sup>	0,03	0,03 <sup>c</sup>	0,03	0,14 <sup>ab</sup>	0,03	0,07 <sup>bc</sup>	0,03	0,12 <sup>bc</sup>	0,03
C20:1	0,77	0,04	0,72	0,04	0,81	0,04	0,71	0,05	0,79	0,04	0,79	0,05
C20:2	0,64	0,04	0,75	0,04	0,63	0,04	0,62	0,05	0,63	0,04	0,65	0,05
C20:3(n-6)	0,16 <sup>a</sup>	0,01	0,07 <sup>c</sup>	0,01	0,12 <sup>b</sup>	0,01	0,06 <sup>c</sup>	0,01	0,05 <sup>c</sup>	0,01	0,12 <sup>b</sup>	0,01
C20:4	0,33	0,03	0,24	0,03	0,23	0,03	0,25	0,03	0,24	0,03	0,29	0,04
C20:3(n-3)	0,23	0,02	0,12	0,03	0,18	0,03	0,13	0,03	0,16	0,03	0,20	0,03
C24:0	0,29	0,06	0,03	0,07	0,18	0,07	0,16	0,08	0,24	0,06	0,26	0,07
C22:6	0,18	0,04	0,05	0,05	0,15	0,05	0,17	0,05	0,12	0,04	0,17	0,05
Σ SAT <sup>2</sup>	32,35 <sup>b</sup>	0,84	35,34 <sup>a</sup>	0,92	35,77 <sup>a</sup>	0,91	34,31 <sup>ab</sup>	1,05	35,13 <sup>a</sup>	0,90	37,03 <sup>a</sup>	1,07
Σ INSAT <sup>3</sup>	46,59	0,98	43,62	1,08	46,09	1,07	43,81	1,23	44,93	1,05	46,29	1,26
Σ POLISAT <sup>4</sup>	19,96	1,12	21,11	1,23	17,94	1,22	21,75	1,41	20,17	1,21	16,32	1,44
Σ POLISAT/Σ SAT <sup>5</sup>	0,62 <sup>ab</sup>	0,04	0,61 <sup>ab</sup>	0,04	0,51 <sup>c</sup>	0,04	0,65 <sup>a</sup>	0,05	0,58 <sup>abc</sup>	0,04	0,44 <sup>c</sup>	0,05
Σ POLISAT/Σ INSAT <sup>6</sup>	0,43	0,03	0,49	0,04	0,39	0,03	0,50	0,04	0,45	0,03	0,36	0,04
Σ SAT/Σ INSAT <sup>7</sup>	0,70	0,03	0,81	0,03	0,78	0,03	0,79	0,03	0,79	0,03	0,81	0,04

<sup>1</sup> Clasificación de las muestras de grasa según las concentraciones de escatol y androstenona determinadas mediante métodos rápidos. (BB) escatol bajo-androstenona baja; (BA) escatol bajo-androstenona alta; (MM) escatol medio:androstenona media; (AB) escatol alto-androstenona baja; (AA) escatol alto-androstenona alta

ΣSAT<sup>4</sup>: porcentaje suma de los ácidos grasos saturados; ΣINSAT<sup>5</sup>: porcentaje suma de los ácidos grasos insaturados; ΣPOLISAT<sup>6</sup>: porcentaje suma de los ácidos grasos poliinsaturados; ΣPOLISAT/ΣSAT<sup>7</sup>: relación entre los porcentajes suma de los ácidos grasos poliinsaturados y saturados; ΣPOLISAT/ΣINSAT<sup>8</sup>: relación entre los porcentajes suma de los ácidos grasos poliinsaturados e insaturados; ΣSAT/ΣINSAT<sup>9</sup>: relación entre los porcentajes suma de los ácidos grasos saturados e insaturados

Tabla 3.37. Composición en ácidos grasos totales (%) de la grasa dorsal de cerdos enteros y hembras según el país de procedencia de las canales. Medias por mínimos cuadrados y error típico (ET). Análisis mediante GC-FID.

	DK <sup>1</sup>		ES <sup>1</sup>		FR <sup>1</sup>		UK <sup>1</sup>		NL <sup>1</sup>		SE <sup>1</sup>	
	X	ET	X	ET	X	ET	X	ET	X	ET	X	ET
C10:0	0,05	0,01	0,04	0,01	0,06	0,01	0,06	0,01	0,05	0,01	0,05	0,01
C12:0	0,08 <sup>b</sup>	0,01	0,10 <sup>b</sup>	0,01	0,08 <sup>b</sup>	0,02	0,08 <sup>b</sup>	0,02	0,36 <sup>a</sup>	0,02	0,08 <sup>b</sup>	0,02
C14:0	1,52 <sup>bc</sup>	0,06	1,46 <sup>c</sup>	0,06	1,71 <sup>ab</sup>	0,09	1,50 <sup>bc</sup>	0,07	1,79 <sup>a</sup>	0,08	1,46 <sup>bc</sup>	0,08
C15:0	0,08	0,01	0,08	0,01	0,06	0,02	0,07	0,02	0,08	0,02	0,08	0,02
C16:0	21,97	0,48	20,81	0,48	22,88	0,72	21,43	0,56	20,48	0,62	20,88	0,65
C16:1(n-11)	0,54	0,03	0,53	0,03	0,49	0,04	0,48	0,03	0,50	0,04	0,55	0,04
C16:1(n-9)	2,80	0,18	2,39	0,18	3,05	0,27	2,62	0,21	2,44	0,23	2,31	0,25
C17:0	0,58	0,05	0,52	0,05	0,50	0,07	0,45	0,06	0,44	0,06	0,54	0,07
C17:1	0,51	0,05	0,45	0,05	0,50	0,07	0,43	0,05	0,41	0,06	0,43	0,06
C18:0	11,50	0,42	10,38	0,42	11,87	0,63	11,15	0,49	9,46	0,55	11,19	0,57
C18:1(n-7)	3,22	0,12	2,95	0,12	3,17	0,18	3,02	0,13	3,07	0,15	2,84	0,16
C18:1(n-9)	37,29	0,77	38,75	0,76	37,96	1,15	37,40	0,88	38,23	0,99	37,43	1,04
C18:2(n-6)	15,69	0,96	17,52	0,95	14,43	1,44	16,82	1,10	17,60	1,24	17,15	1,30
C18:3 $\gamma$	0,04	0,01	0,04	0,01	0,04	0,01	0,04	0,01	0,04	0,01	0,04	0,01
C18:3 $\alpha$	1,51	0,18	1,45	0,18	1,09	0,28	1,87	0,21	1,90	0,24	1,95	0,25

<sup>1</sup> País de procedencia de las canales analizadas. (DK) Dinamarca; (ES) España; (FR) Francia; (UK) Reino Unido; (NL) Holanda; SE (Suecia)

Tabla 3.38. Composición en ácidos grasos totales (%) de la grasa dorsal de cerdos enteros y hembras según el país de procedencia de las canales. Medias por mínimos cuadrados y error típico (ET). Análisis mediante GC-FID.

	DK <sup>1</sup>		ES <sup>1</sup>		FR <sup>1</sup>		UK <sup>1</sup>		NL <sup>1</sup>		SE <sup>1</sup>	
	X	ET	X	ET	X	ET	X	ET	X	ET	X	ET
C20:0	0,09	0,03	0,10	0,03	0,08	0,04	0,08	0,03	0,14	0,03	0,16	0,03
C20:1	0,80	0,03	0,83	0,03	0,69	0,05	0,74	0,04	0,72	0,05	0,80	0,05
C20:2	0,64	0,04	0,72	0,04	0,61	0,06	0,60	0,04	0,68	0,05	0,65	0,05
C20:3(n-6)	0,10 <sup>ab</sup>	0,01	0,09 <sup>abc</sup>	0,01	0,06 <sup>c</sup>	0,01	0,08 <sup>bc</sup>	0,01	0,12 <sup>a</sup>	0,01	0,11 <sup>ab</sup>	0,01
C20:4	0,29	0,03	0,23	0,03	0,28	0,04	0,22	0,03	0,31	0,03	0,26	0,04
C20:3(n-3)	0,16	0,02	0,16	0,02	0,12	0,03	0,14	0,03	0,23	0,03	0,19	0,03
C24:0	0,25 <sup>ab</sup>	0,06	0,11 <sup>bc</sup>	0,06	0,17 <sup>abc</sup>	0,09	0,39 <sup>a</sup>	0,07	0,30 <sup>a</sup>	0,07	0,07 <sup>c</sup>	0,03
C22:6(n-3)	0,22 <sup>ab</sup>	0,04	0,10 <sup>bc</sup>	0,04	0,18 <sup>ab</sup>	0,06	0,29 <sup>a</sup>	0,05	0,08 <sup>bc</sup>	0,05	0,02 <sup>c</sup>	0,02
ΣSAT <sup>2</sup>	36,12	0,81	33,59	0,80	37,44	1,21	35,17	0,93	33,05	1,04	34,56	1,10
ΣINSAT <sup>3</sup>	45,16	0,95	45,91	0,94	45,86	1,42	44,68	1,09	45,38	1,22	44,35	1,28
ΣPOLISAT <sup>4</sup>	18,65	1,08	20,33	1,08	16,84	1,63	20,04	1,25	20,94	1,40	20,45	1,47
ΣPOLISAT/ΣSAT <sup>5</sup>	0,53	0,04	0,61	0,04	0,45	0,06	0,57	0,05	0,64	0,05	0,60	0,05
ΣPOLISAT/ΣINSAT <sup>6</sup>	0,42	0,03	0,45	0,03	0,37	0,05	0,45	0,04	0,47	0,04	0,46	0,04
ΣSAT/ΣINSAT <sup>7</sup>	0,80	0,03	0,74	0,03	0,83	0,04	0,79	0,03	0,73	0,03	0,78	0,04

<sup>1</sup> País de procedencia de las canales analizadas. (DK) Dinamarca; (ES) España; (FR) Francia; (UK) Reino Unido; (NL) Holanda; SE (Suecia)

ΣSAT<sup>2</sup>: porcentaje suma de ácidos grasos saturados; ΣINSAT<sup>3</sup>: porcentaje suma de ácidos grasos insaturados; ΣPOLISAT<sup>4</sup>: porcentaje suma de ácidos grasos poliinsaturados; ΣPOLISAT/ΣSAT<sup>5</sup>: relación entre los porcentajes suma de los ácidos grasos poliinsaturados y saturados; ΣPOLISAT/ΣINSAT<sup>6</sup>: relación entre los porcentajes suma de los ácidos grasos poliinsaturados e insaturados; ΣSAT/ΣINSAT<sup>7</sup>: relación entre los porcentajes suma de los ácidos grasos saturados e insaturados

Tabla 3.39. Composición en ácidos grasos totales (%) de la grasa dorsal de cerdos enteros y hembras según la valoración sensorial de los miembros de un panel test. Medias por mínimos cuadrados (X) y error típico (ET). Análisis mediante GC-FID.

	BT <sup>1</sup>		C <sup>1</sup>	
	X	ET	X	ET
C10:0	0,05	0,01	0,05	0,01
C12:0	0,13	0,01	0,13	0,01
C14:0	1,56	0,04	1,59	0,04
C15:0	0,07	0,01	0,08	0,01
C16:0	21,53	0,32	21,29	0,35
C16:1(n-11)	0,50	0,02	0,53	0,02
C16:1(n-9)	2,72	0,12	2,48	0,13
C17:0	0,50	0,03	0,51	0,04
C17:1	0,48	0,03	0,43	0,03
C18:0	10,71	0,28	11,14	0,31
C18:1(n-9)	38,93 <sup>a</sup>	0,51	36,76 <sup>b</sup>	0,55
C18:1(n-7)	3,03	0,08	3,06	0,08
C18:2(n-6)	15,77	0,64	17,30	0,69
C18:3 $\gamma$	0,04	0,01	0,04	0,01
C18:3 $\alpha$	1,46	0,12	1,80	0,13
C20:0	0,10	0,02	0,11	0,02
C20:1	0,75	0,02	0,78	0,03
C20:2	0,63	0,03	0,68	0,03
C20:3(n-6)	0,10	0,01	0,09	0,01
C20:4	0,28	0,02	0,25	0,02
C20:3(n-3)	0,16	0,02	0,18	0,02
C24:0	0,17	0,04	0,21	0,04
C22:6(n-3)	0,09 <sup>b</sup>	0,03	0,19 <sup>a</sup>	0,03
$\Sigma$ SAT <sup>2</sup>	34,85	0,54	35,12	0,58
$\Sigma$ INSAT <sup>3</sup>	46,41 <sup>a</sup>	0,63	44,04 <sup>b</sup>	0,68
$\Sigma$ POLISAT <sup>4</sup>	18,54	0,72	20,55	0,78
$\Sigma$ POLISAT/ $\Sigma$ SAT <sup>5</sup>	0,54	0,03	0,60	0,03
$\Sigma$ POLISAT/ $\Sigma$ INSAT <sup>6</sup>	0,41 <sup>b</sup>	0,02	0,47 <sup>a</sup>	0,02
$\Sigma$ SAT/ $\Sigma$ INSAT <sup>7</sup>	0,75	0,02	0,80	0,02

<sup>1</sup>Clasificación de las muestras de grasa según el análisis sensorial. (BT) muestras con olor sexual; (C) muestras control

$\Sigma$ SAT<sup>2</sup>:porcentaje suma de ácidos grasos saturados;  $\Sigma$ INSAT<sup>3</sup>:porcentaje suma de ácidos grasos insaturados;  $\Sigma$ POLISAT<sup>4</sup>: porcentaje suma de ácidos grasos poliinsaturados;  $\Sigma$ POLISAT/ $\Sigma$ SAT<sup>5</sup>: relación entre los porcentajes suma de los ácidos grasos poliinsaturados y saturados;  $\Sigma$ POLISAT/ $\Sigma$ INSAT<sup>6</sup>: relación entre los porcentajes suma de los ácidos grasos poliinsaturados e insaturados;  $\Sigma$ SAT/ $\Sigma$ INSAT<sup>7</sup>: relación entre los porcentajes suma de los ácidos grasos saturados e insaturados

**Tabla 3.40. Composición (%) C24:0 y C22:6 de muestras de grasa dorsal de cerdos enteros y hembras. Análisis de la varianza. Interacción Grupo x Clase. Medias por mínimos cuadrados (X) y error típico (ET). Análisis mediante GC-FID.**

	C24:0		C22:6(n-3)	
	X	ET	X	ET
BB <sup>1</sup> xC <sup>2</sup>	0,42 <sup>ac</sup>	0,09	0,35 <sup>a</sup>	0,06
BB <sup>1</sup> xBT <sup>2</sup>	0,16 <sup>bd</sup>	0,09	0,01 <sup>d</sup>	0,06
BA <sup>1</sup> xC <sup>2</sup>	0,01 <sup>b</sup>	0,10	0,07 <sup>cd</sup>	0,07
BA <sup>1</sup> xBT <sup>2</sup>	0,06 <sup>b</sup>	0,08	0,03 <sup>cd</sup>	0,06
MM <sup>1</sup> xC <sup>2</sup>	0,18 <sup>abcd</sup>	0,10	0,12 <sup>bcd</sup>	0,07
MM <sup>1</sup> xBT <sup>2</sup>	0,17 <sup>bcd</sup>	0,08	0,17 <sup>bc</sup>	0,06
AB <sup>1</sup> xC <sup>2</sup>	0,07 <sup>b</sup>	0,11	0,19 <sup>abc</sup>	0,08
AB <sup>1</sup> xBT <sup>2</sup>	0,25 <sup>abcd</sup>	0,09	0,14 <sup>bcd</sup>	0,06
AA <sup>1</sup> xC <sup>2</sup>	0,11 <sup>bd</sup>	0,10	0,09 <sup>cd</sup>	0,07
AA <sup>1</sup> xBT <sup>2</sup>	0,37 <sup>ad</sup>	0,07	0,16 <sup>bcd</sup>	0,05
HEMBRASxC <sup>2</sup>	0,50 <sup>a</sup>	0,11	0,33 <sup>ab</sup>	0,08
HEMBRASxBT <sup>2</sup>	0,02 <sup>b</sup>	0,11	0,02 <sup>cd</sup>	0,08

<sup>1</sup>Clasificación de las muestras de grasa según las concentraciones de escatol y androstenona determinadas mediante métodos rápidos. (BB) escatol bajo-androstenona baja; (BA) escatol bajo-androstenona alta; (MM) escatol medio:androstenona media; (AB) escatol alto-androstenona baja; (AA) escatol alto-androstenona alta

<sup>2</sup> Clasificación de las muestras de grasa según el análisis sensorial. (BT) muestras con olor sexual; (C) muestras control



Tabla 3.41. Coeficientes de correlación de *Pearson* entre los porcentajes de ácidos grasos totales determinados en grasa dorsal de cerdos enteros y hembras. Análisis mediante GC-FID.

	C10:0	C12:0	C14:0	C15:0	C16:0	C16:1 (n-11)	C16:1 (n-9)	C17:0	C17:1	C18:0	C18:1 (n-7)	C18:1 (n-9)	C18:2 (n-6)	C18:3 $\gamma$	C18:3 $\alpha$	C20:0	C20:1	C20:2	C20:3 (n-6)	C20:4	C20:3 (n-3)	C24:0	C22:6 (n-3)	
C10:0	1,000																							
C12:0	-0,007	1,000																						
C14:0	-0,017	0,556***	1,000																					
C15:0	0,496***	-0,018	-0,096	1,000																				
C16:0	0,401**	-0,244	0,222	0,142	1,000																			
C16:1 (n-11)	-0,246	0,152	0,212	0,184	-0,320*	1,000																		
C16:1 (n-9)	0,169	-0,146	0,221	0,024	0,383**	0,013	1,000																	
C17:0	0,117	-0,130	-0,103	0,584***	0,219	0,315*	0,001	1,000																
C17:1	0,187	-0,187	-0,083	0,542***	0,303*	0,161	0,391**	0,793***	1,000															
C18:0	0,265	-0,399**	-0,200	-0,012	0,602***	-0,361*	-0,120	0,244	0,113	1,000														
C18:1 (n-7)	0,192	-0,095	-0,235	-0,015	-0,105	-0,142	0,362*	-0,304*	0,067	-0,177	1,000													
C18:1 (n-9)	0,203	-0,024	0,083	0,151	0,139	0,139	0,759***	-0,013	0,335*	-0,176	0,559***	1,000												
C18:2(n-6)	-0,512***	0,243	0,042	-0,240	-0,578***	0,268	-0,528***	-0,072	-0,372**	-0,435**	-0,617***	-0,598***	1,000											
C18:3 $\gamma$	0,123	-0,145	-0,414**	0,403**	0,154	-0,151	-0,111	0,355*	0,252	0,240	-0,074	-0,006	-0,159	1,000										
C18:3 $\alpha$	-0,354*	0,280	0,126	-0,185	-0,610***	0,173	-0,454**	-0,163	-0,339*	-0,372*	-0,373**	-0,370*	0,567***	-0,126	1,000									
C20:0	-0,140	0,179	-0,067	0,184	-0,474***	0,194	-0,221	0,084	0,015	-0,335*	-0,051	-0,092	0,151	0,184	0,546***	1,000								
C20:1	0,194	-0,128	-0,173	0,198	0,023	-0,139	-0,177	0,022	-0,128	0,187	0,180	0,086	-0,230	-0,003	-0,188	0,047	1,000							
C20:2	-0,300*	0,060	-0,135	-0,091	-0,353*	0,026	-0,548***	-0,114	-0,327*	-0,140	-0,342*	-0,430**	0,666***	-0,053	0,058	-0,076	0,144	1,000						
C20:3 (n-6)	0,346*	0,052	-0,251	0,568***	-0,206	0,091	-0,115	0,255	0,251	-0,022	0,090	-0,010	-0,094	0,258	-0,106	0,278	0,256	0,096	1,000					
C20:4	-0,026	0,092	-0,036	0,321*	-0,040	0,446**	0,323*	0,355*	0,419**	-0,156	0,028	0,407**	-0,122	0,095	-0,216	0,173	-0,144	-0,115	0,330*	1,000				
C20:3 (n-3)	0,132	0,335*	-0,097	0,289*	-0,495***	0,086	-0,316*	0,024	-0,103	-0,279	-0,032	-0,033	0,145	0,135	0,508***	0,571***	0,254	0,095	0,387**	0,187	1,000			
C24:0	0,079	0,015	0,075	0,122	0,031	-0,058	0,129	0,021	0,006	-0,018	-0,275	-0,068	0,026	0,111	0,314*	0,122	-0,159	-0,313*	0,026	0,158	0,287*	1,000		
C22:6 (n-3)	0,225	-0,215	-0,053	0,402**	0,247	-0,045	0,273	0,326*	0,336*	0,180	-0,243	0,182	-0,191	0,217	0,003	-0,052	0,077	-0,329*	0,116	0,182	0,111	0,518***	1,000	

Nivel de significación: \*\*\* (P<0,001); \*\* (P<0,01); \* (P<0,05)

Tabla 3.42. Coeficientes de correlación de *Pearson* entre los porcentajes suma de los ácidos grasos insaturados, saturados y poliinsaturados y las concentraciones de indol, escatol, androstenona y androstenoles ( $\mu\text{g/g}$ ) en grasa dorsal de cerdos enteros y hembras. Análisis mediante GC-FID, HPLC-FN y GC-MS.

	Peso	Magro	$\Sigma\text{POLISAT}/\Sigma\text{SAT}^1$	$\Sigma\text{POLISAT}/\Sigma\text{INSAT}^2$	$\Sigma\text{SAT}/\Sigma\text{INSAT}^3$	$\Sigma\text{SAT}^4$	$\Sigma\text{INSAT}^5$	$\Sigma\text{POLISAT}^6$	Indol	Escatol	5 $\alpha$ -An	5 $\alpha$ -An-3 $\alpha$ -ol	5 $\alpha$ -An-3 $\beta$ -ol
Peso	1,0000												
Magro	-0,2287	1,0000											
$\Sigma\text{POLISAT}/\Sigma\text{SAT}^1$	0,1214	-0,1094	1,0000										
$\Sigma\text{POLISAT}/\Sigma\text{INSAT}^2$	0,0785	-0,1463	0,8826***	1,0000									
$\Sigma\text{SAT}/\Sigma\text{INSAT}^3$	-0,0660	-0,0707	-0,2894*	0,1813	1,0000								
$\Sigma\text{SAT}^4$	-0,1298	0,0192	-0,7880***	-0,4186**	0,8119***	1,0000							
$\Sigma\text{INSAT}^5$	-0,0372	0,1343	-0,4886***	-0,8280***	-0,6883***	-0,1392	1,0000						
$\Sigma\text{POLISAT}^6$	0,0964	-0,1400	0,9558***	0,9783***	-0,0150	-0,5869***	-0,7043***	1,0000					
Indol	0,2396	-0,0857	0,1838	0,0921	-0,2064	-0,2445	0,0395	0,1427	1,0000				
Escatol	0,0624	-0,0837	0,1642	0,1660	-0,0298	-0,1058	-0,0863	0,1835	0,5675***	1,0000			
5 $\alpha$ -An	-0,0063	-0,1140	0,1658	0,2220	0,0842	-0,0175	-0,1738	0,2261	0,2059	0,2738	1,0000		
5 $\alpha$ -An-3 $\alpha$ -ol	0,0889	-0,2154	0,2172	0,3098*	0,1805	0,0087	-0,2996*	0,2883*	0,2059	0,1795	0,7955***	1,0000	
5 $\alpha$ -An-3 $\beta$ -ol	0,0627	-0,2337	0,2642	0,3205*	0,1013	-0,0690	-0,2589	0,3168*	0,2053	0,2486	0,8011***	0,9242***	1,0000

<sup>1</sup> $\Sigma\text{POLISAT}/\Sigma\text{SAT}$ : relación entre los porcentajes suma de los ácidos grasos poliinsaturados y saturados; <sup>2</sup> $\Sigma\text{POLISAT}/\Sigma\text{INSAT}$ : relación entre los porcentajes suma de los ácidos grasos poliinsaturados e insaturados; <sup>3</sup> $\Sigma\text{SAT}/\Sigma\text{INSAT}$ : relación entre los porcentajes suma de los ácidos grasos saturados e insaturados; <sup>4</sup> $\Sigma\text{SAT}$ : porcentaje suma de los ácidos grasos saturados; <sup>5</sup> $\Sigma\text{INSAT}$ : porcentaje suma de los ácidos grasos insaturados; <sup>6</sup> $\Sigma\text{POLISAT}$ : porcentaje suma de los ácidos grasos poliinsaturados

5 $\alpha$ -An: 5 $\alpha$ -androst-16-en-3-ona; 5 $\alpha$ -An-3 $\alpha$ -ol: 5 $\alpha$ -androst-16-en-3 $\alpha$ -ol; 5 $\alpha$ -An-3 $\beta$ -ol: 5 $\alpha$ -androst-16-en-3 $\beta$ -ol

Nivel de significación: \*\*\* (P<0,001); \*\* (P<0,01); \* (P<0,05)

Tabla 3.43. Coeficientes de correlación de *Pearson* entre los porcentajes de ácidos grasos totales y las concentraciones ( $\mu\text{g/g}$ ) de escatol, indol, androstenona y androstenoles en grasa dorsal de cerdos enteros y hembras. Análisis mediante GC-FID, HPLC-FN y GC-MS.

	C10:0	C15:0	C17:1	C18:2(n-6)	C18:3 $\gamma$	C20:2	C20:3(n-6)	C20:4	C24:0
Indol	-0,3038*	-0,2859	-0,2009	0,1507	-0,1293	0,2138	-0,2780	-0,0011	-0,1145
Escatol	-0,3865**	-0,4452**	-0,3338*	0,1774	-0,2130	-0,0916	-0,3783**	-0,1057	0,3453*
5 $\alpha$ -An	-0,4823***	-0,4390**	-0,1517	0,2567	-0,3630*	0,2312	-0,5669***	-0,1318	-0,1484
5 $\alpha$ -An-3 $\alpha$ -ol	-0,3671*	-0,4012**	-0,3005*	0,3234*	-0,2720	0,4175**	-0,4433**	-0,3476*	-0,1553
5 $\alpha$ -An-3 $\beta$ -ol	-0,4286**	-0,3815**	-0,2259	0,3456*	-0,2570	0,4011**	-0,4433**	-0,3504*	-0,1128

5 $\alpha$ -An: 5 $\alpha$ -androst-16-en-3-ona; 5 $\alpha$ -An-3 $\alpha$ -ol: 5 $\alpha$ -androst-16-en-3 $\alpha$ -ol; 5 $\alpha$ -An-3 $\beta$ -ol: 5 $\alpha$ -androst-16-en-3 $\beta$ -ol

Nivel de significación: \*\*\* (P<0,001); \*\* (P<0,01); \* (P<0,05)

### 3.4. Análisis del perfil de volátiles en muestras de grasa dorsal procedentes de canales de cerdos enteros y hembras. Técnicas de Head Space

Las técnicas de *Head Space* son las más utilizadas en el estudio de los compuestos volátiles responsables del aroma de un producto alimentario. Las técnicas de *Head Space* empleadas en el desarrollo del presente proyecto de Tesis difieren en el sistema de obtención de los compuestos volátiles y en el tipo de información facilitada.

#### 3.4.1. *Head Space* estático

En las técnicas de *Head Space* estático los compuestos volátiles se obtienen a partir del equilibrio que se establece entre dos fases: líquido-vapor y sólido-vapor. En ambos casos, la fase vapor se enriquece en aquellos componentes que presentan una mayor volatilidad a la temperatura de trabajo establecida. La técnica de *Head Space* estático permitió la evaluación de la transferencia del indol, del escatol y de la androstenona a la fase vapor y facilitó la interpretación y evaluación de la influencia que ejercen las condiciones experimentales establecidas en un estudio sensorial.

El estudio de la transferencia a la fase vapor de los compuestos relacionados con el olor sexual en soluciones patrón mostró que aproximadamente un 20-30% de las concentraciones iniciales de indol y escatol añadidas al vial se recuperan en la fase vapor. Sin embargo, la transferencia a la fase vapor de la androstenona en las mismas condiciones experimentales fue inferior al 5%.

Los porcentajes de recuperación obtenidos disminuyeron drásticamente cuando el mismo estudio se repitió en presencia de grasa dorsal de cerdo. En estas condiciones, los valores obtenidos para el indol y el escatol fueron respectivamente inferiores al 10% y al 5%. Por otra parte, la androstenona no se detectó con el sistema de detección utilizado (detector de ionización de llama), indicando que su transferencia a la fase vapor fue inferior al 1%.

Los cromatogramas de GC-FID obtenidos mediante técnicas de *Head Space* estático a partir de una solución patrón de indol, escatol y androstenona y de una muestra de grasa dorsal porcina a la que se adicionaron 20 µg/g de estos compuestos se presentan en la Figura 3.37 y Figura 3.38, respectivamente.

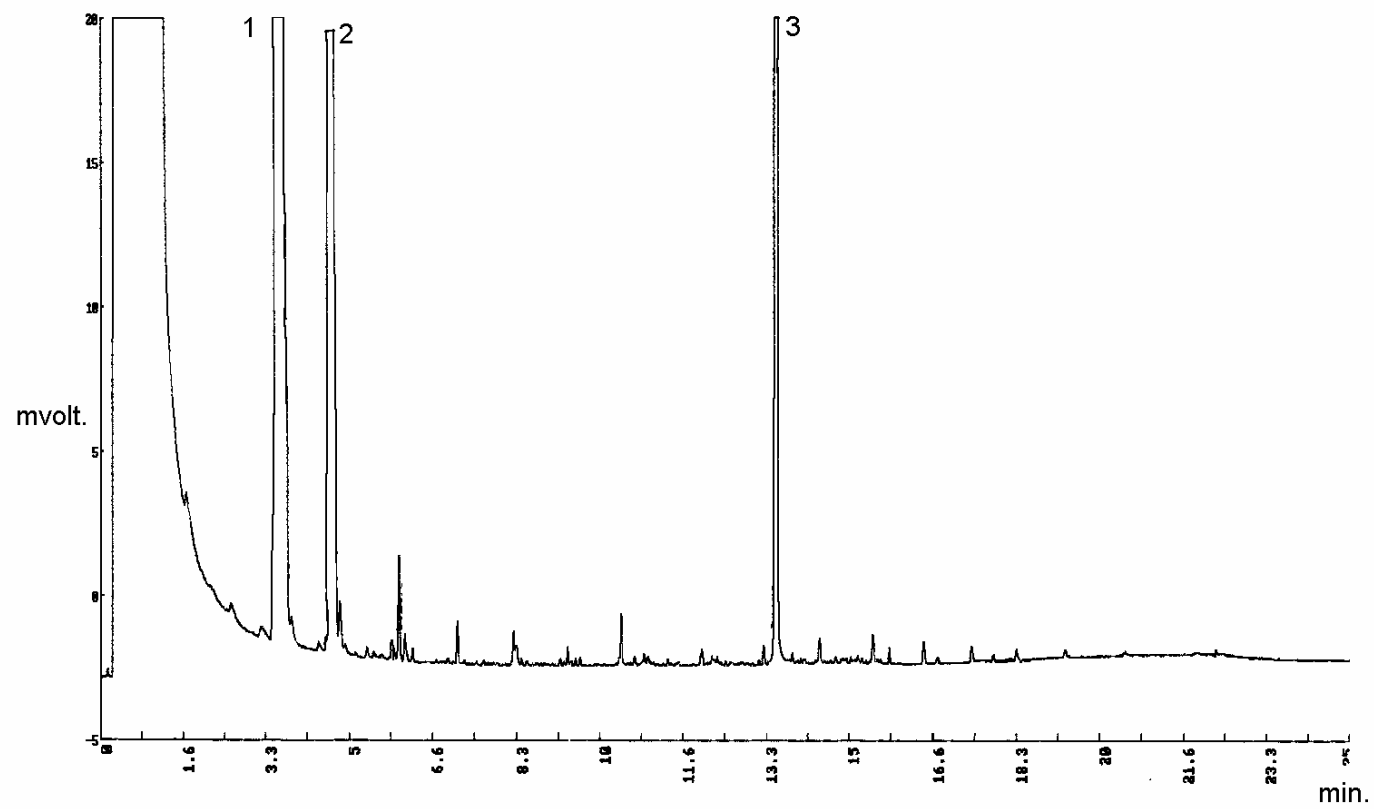


Figura 3.37. Cromatograma de GC-FID de una solución patrón de (1) indol, (2) escatol y (3) androstenona obtenido mediante técnicas de *Head Space* estático

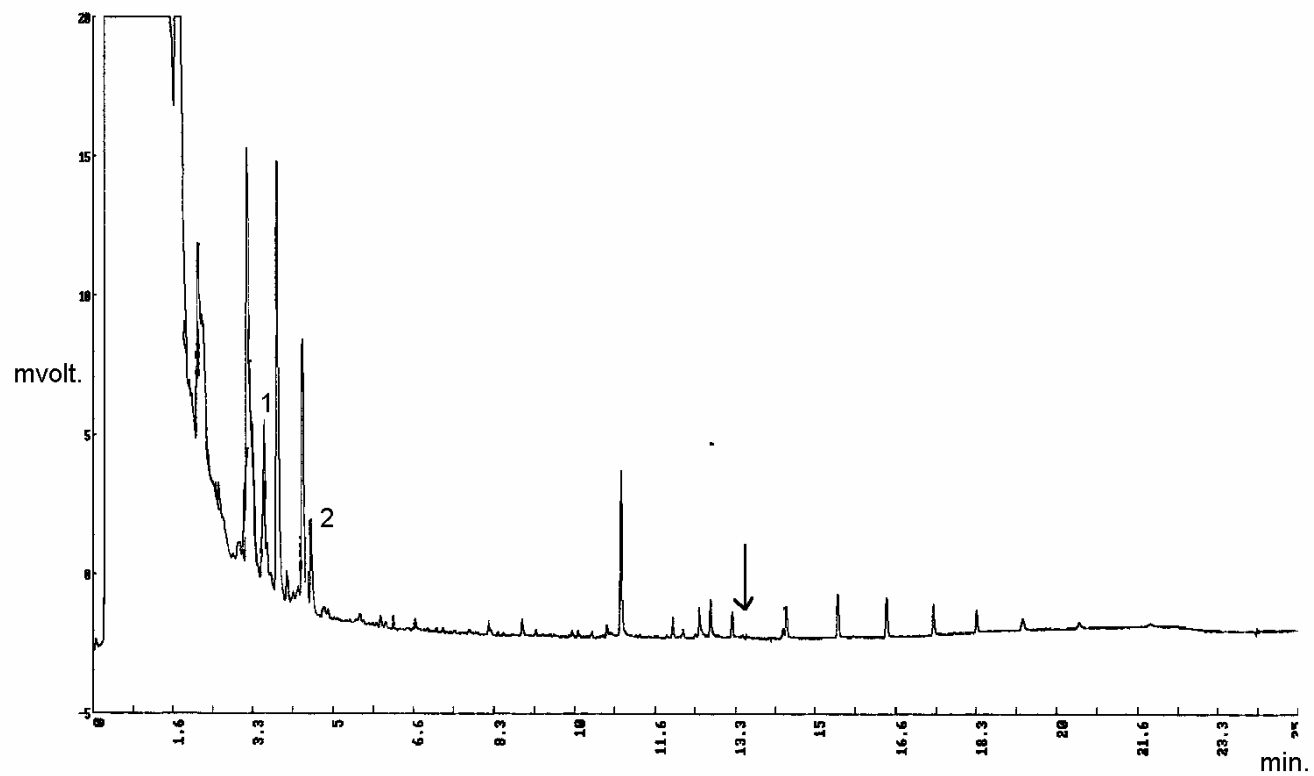


Figura 3.38. Cromatograma de GC-FID de una muestra de grasa dorsal de cerdo a la que se adicionaron 20  $\mu\text{g/g}$  de escatol, indol y androstenona obtenido mediante técnicas de *Head Space* estático. Identificación de los picos: (1) indol y (2) escatol. Con una flecha se señala la zona del  $t_R$  de la androstenona

### 3.4.2. *Head Space* dinámico

Los compuestos volátiles presentes en las muestras de grasa dorsal procedentes de canales de cerdos enteros y hembras se aislaron mediante un sistema de espacio de cabeza o *Head Space* dinámico acoplado a una trampa de adsorción de carbono grafitado, que permite la concentración de las moléculas responsables del aroma (Retorik, Suiza).

La recuperación del indol y escatol en el adsorbente utilizado (carbono grafitado) evaluada en muestras de grasa dorsal fortificadas y mantenidas a una temperatura de 120°C bajo un flujo de helio de 50 ml/min fue prácticamente completa después de 30 minutos de análisis (Rius, 1997), aunque en el desarrollo de este trabajo de Tesis se decidió prolongar el tiempo de análisis hasta 60 minutos para asegurar una recuperación completa de los compuestos de menor volatilidad presentes en la grasa. La determinación de androstenona no fue posible en las condiciones experimentales aplicadas, debido a su baja volatilidad.

La determinación posterior de los compuestos volátiles obtenidos se realizó mediante cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas. La deadsorción de los volátiles se realizó por la acción de microondas que permite un proceso de deadsorción rápido y una introducción óptima de los compuestos en el interior de la columna. El estudio del tiempo y de la temperatura de la interfase deadsorbedor-columna estableció las condiciones de deadsorción en 9 segundos y 180°C.

La identificación de los compuestos volátiles se efectuó por comparación entre los espectros de masas obtenidos y los presentes en la librería espectral y según su tiempo de retención (tR), aunque también se consideró la probabilidad de la presencia de los compuestos evaluados en la grasa dorsal porcina. La cuantificación se realizó mediante la comparación de áreas, la de los compuestos en estudio y la del d8-tolueno, adicionado a las muestras como patrón interno. Entre todos los compuestos detectados sólo se cuantificaron aquellos que presentaron probabilidades de identificación elevadas (*Quality match* >80%).

Los compuestos volátiles aislados de la grasa dorsal de cerdo pertenecieron a familias químicas distintas (Tabla 3.44). Los hidrocarburos y los aldehidos representaron la mayor proporción de compuestos identificados, seguidos de los ácidos grasos de cadena corta y de hidrocarburos aromáticos derivados del benceno. Además, también se identificaron productos de contaminación

(ftalatos), un derivado del furano (furano-2-pentil) y dos compuestos clorados (1,4-diclorobenceno y tetracloroetano). El cromatograma de GC-MS del perfil de volátiles obtenido de una muestra de grasa dorsal de cerdo mediante técnicas de Head Space dinámico se presenta en la Figura 3.39.

La mayoría de aldehidos identificados fueron de cadena lineal, tanto saturada como insaturada. El porcentaje total del área de los aldehidos fue similar en todos los grupos de concentraciones de escatol y androstenona evaluados ( $24,72 \pm 2,86\%$ ), excepto en las muestras de grasa con concentraciones bajas de escatol y androstenona (BB), que presentaron un porcentaje significativamente superior ( $69,61\%$ ). Además, algunos aldehidos, como el decanal, 2-decenal, undecanal y dodecanal, se detectaron únicamente en este grupo de muestras. El hexanal fue el aldehido mayoritario en todos los grupos evaluados con un porcentaje medio de  $11,53 \pm 0,17\%$ , aunque su porcentaje fue superior ( $24,05 \pm 11,75\%$ ) en muestras de grasa pertenecientes al grupo de concentraciones bajas (BB). El 2,4-decadienal fue el segundo aldehido de mayor porcentaje ( $21,69 \pm 10,33\%$ ) en las muestras del grupo BB, superior al resto de muestras evaluadas ( $4,09 \pm 1,62\%$ ). El resto de aldehidos identificados mostraron valores próximos al 2% en todos los grupos de muestras del estudio.

La familia de los hidrocarburos representó un porcentaje medio del  $46,87 \pm 4,85\%$  del área total de los compuestos considerados en este estudio e incluyó hidrocarburos saturados (hexano, heptano, decano), insaturados (2-octeno, 4-octeno) y de cadena ramificada (tetrametilbutano, pentametilheptano), además de dos compuestos de estructura terpenoide ( $\alpha$ -pineno y limoneno). El pentametilheptano y el decano, seguidos del hexano y del tetrametilbutano, fueron los hidrocarburos con mayores porcentajes en todos los grupos de concentraciones evaluados.

Algunos hidrocarburos aromáticos derivados del benceno, como el tolueno, el xileno, el estireno, el etilbenceno y el benzaldehido, también se identificaron en esta familia. El porcentaje medio del área total de estos compuestos fue significativamente distinto entre las muestras de grasa clasificadas con concentraciones bajas de escatol y androstenona (BB) y el resto de grupos evaluados (AA, BA, AB, MM y hembras) ( $4,13\%$  y  $15,48\%$ , respectivamente). El tolueno se detectó en todas las muestras de grasa analizadas, con un porcentaje cercano al 2% en las muestras del grupo BB y al 6% en el resto de grupos considerados (AA, AB, BA, MM y hembras). El benzaldehido, el xileno y el benceno fueron los siguientes compuestos aromáticos en orden de abundancia.



Tabla 3.44. Compuestos volátiles identificados en muestras de grasa dorsal porcina mediante técnicas de *Head Space* dinámico.

Familia	Compuesto
	2-metilpropanal
	pentanal
	2-pentenal
	hexanal
	2-hexenal
	heptanal
	2-heptenal
<i>Aldehidos</i>	2,4-heptadienal
	octanal
	2-octenal
	nonanal
	2-nonenal
	decanal
	2-decenal
	2,4-decadienal
	2-undecenal
	<i>Ácidos</i>
heptanoico	
octanoico	
nonanoico	
acético	
	2-metilpropanoico
	Bis-(2-metilpropil)-hexanodioico

(sigue)

(continúa)

---

	1,3-pentadieno
	1,3-ciclopentadieno
	2,2,4,4-tetrametilbutano
	hexano
	3-etil-4-metil-hexano
	heptano
	2-octeno
	4-octeno
	3-metilheptano
	3-metilnonano
	2,3,7-trimetiloctano
<i>Hidrocarburos</i>	2,2,4,6,6-pentametilheptano
	cicloheptano
	metilciclohexano
	decano
	undecano
	dodecano
	tetradecano
	pentadecano
	hexadecano
	eicosano
	$\alpha$ -pineno
	limoneno
	benceno
	tolueno
	1,3-dimetilbenceno
<i>Derivados del benceno</i>	etilbenceno
	xileno
	estireno
	benzaldehido

---

(sigue)

(continúa)

---

	1-penten-3-ol
	1-octen-3-ol
	1-hexanol
<i>Alcoholes</i>	1-octanol
	2-decanol
	2-propildecanol
	1-tetradecanol
	2-heptanona
<i>Cetonas</i>	3,5-octadien-2-ona
	2-pentadecanona
	1,4-diclorobenceno
<i>Organoclorados</i>	tetracloroetano
	furano-2-pentil
	ftalatos
<i>Otros</i>	naftaleno
	indol
	escatol

---

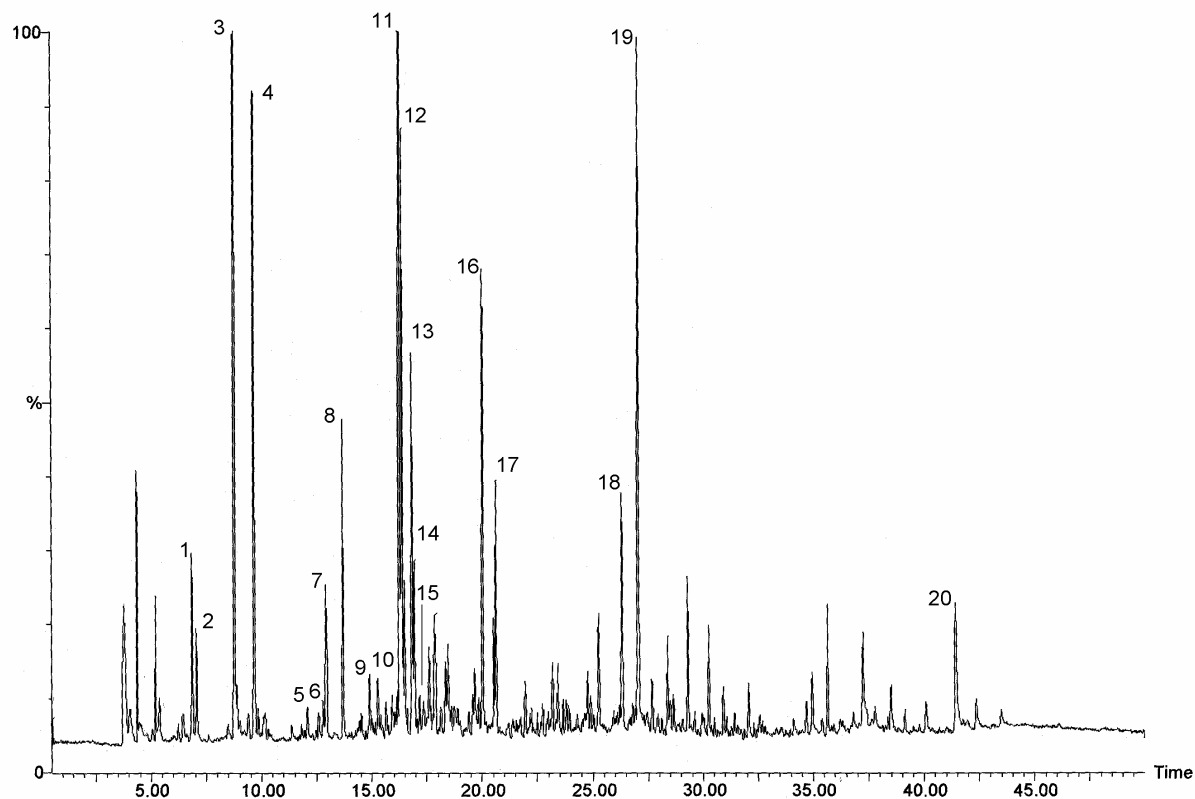


Figura 3.39. Cromatograma *TIC* de GC-MS del perfil de volátiles de una muestra de grasa dorsal porcina mediante *Head Space* dinámico. Identificación de los picos: (1) tetrametilbutano, (2) heptano, (3) IS (d8-tolueno), (4) hexanal, (5) 2-heptanona, (6) estireno, (7) heptanal, (8) ácido hexanoico, (9) 2-heptenal, (10) benzaldehido, (11) pentametilheptano, (12) decano, (13) octanal, (14) 1,4-diclorobenceno, (15), ácido heptanoico, (16) nonanal, (17) ácido octanoico, (18) 2-decenal, (19) 2,4-decadienal y (20) ftalato

Los ácidos orgánicos detectados en las muestras de grasa dorsal de cerdo mediante la técnica de Head Space dinámico correspondieron básicamente a ácidos grasos de cadena corta. El porcentaje medio del área total de los compuestos identificados fue de  $8,72 \pm 3,36\%$ . El ácido octanoico presentó el mayor porcentaje ( $4,80 \pm 1,89\%$ ), seguido del hexanoico ( $3,36 \pm 1,75\%$ ) y del heptanoico ( $0,47 \pm 0,25\%$ ). El ácido nonanoico fue detectado únicamente en las muestras de grasa dorsal clasificadas con concentraciones elevadas de escatol (AA y AB).

Dentro de la familia de los alcoholes y de las cetonas sólo se identificaron con fiabilidad el 1-octen-3-ol y la 2-heptanona, con unos porcentajes medios totales de  $1,80 \pm 0,27\%$  y  $0,51 \pm 0,25\%$ , respectivamente. Las muestras de grasa clasificadas previamente con concentraciones bajas de escatol y androstenona (BB) presentaron un porcentaje medio de 1-octen-3-ol inferior al resto de grupos de concentración considerados.

El compuesto derivado del furano, el furano-2-pentil, se detectó en todos los grupos de muestras analizadas con un porcentaje medio de  $1,29 \pm 0,35\%$ .

Diversos compuestos producto de posibles contaminaciones externas, como el estireno, los ftalatos y los compuestos con átomos de cloro en su estructura química, también se detectaron en las muestras de grasa analizadas. El 1,4-diclorobenceno se detectó únicamente en las muestras de grasa clasificadas con concentraciones bajas de escatol y androstenona (BB). Los resultados del análisis de la varianza mostraron que la concentración media de 1,4-diclorobenceno fue significativamente superior ( $P < 0,01$ , Tabla 3.45) en las muestras de grasa dorsal clasificadas con olor sexual por los miembros del panel test. El cromatograma de GC-MS en modo SCAN del perfil de volátiles de una muestra de grasa dorsal perteneciente al grupo de concentraciones BB y clasificada con defecto sensorial se presenta en la Figura 3.40 (1B). La selección del fragmento característico del 1,4-diclorobenceno obtenido por impacto electrónico ( $m/z$  146) reveló su presencia en el cromatograma de ión total (Figura 3.40, 1A). La comparación entre el espectro de masas del pico identificado como 1,4-diclorobenceno (C) en las muestras de grasa y el espectro facilitado por la librería espectral (D) se presenta en la Figura 3.40 (2).

La concentración media de estireno determinada en muestras de grasa dorsal pertenecientes al grupo de concentraciones bajas de escatol y androstenona (BB) fue significativamente superior en las muestras clasificadas con olor sexual por los miembros de un panel test ( $P < 0,001$ , Tabla 3.45).

El análisis de los compuestos relacionados con el olor sexual mediante las técnicas de *Head Space* resulta complejo debido a su volatilidad relativa. Sin embargo, el indol y el escatol se detectaron en las muestras de grasa pertenecientes a los grupos de concentraciones elevadas de escatol (AA y AB). La concentración media de escatol fue significativamente superior ( $P < 0,05$ ) en las muestras de grasa clasificadas con olor sexual por los miembros de un panel test, según se muestra en la Tabla 3.46. La androstenona no se detectó en ninguna muestra mediante la técnica de *Head Space* dinámico desarrollada en este estudio.

Los niveles de significación obtenidos en el tratamiento estadístico de las muestras analizadas se presentan en la Tabla 3.47 y Tabla 3.48. Los compuestos volátiles identificados influidos significativamente por el peso y porcentaje de magro de las canales se indican en la Tabla 3.49.

Las concentraciones medias de los aldehidos heptanal ( $P < 0,05$ ), octanal ( $P < 0,01$ ) y nonanal ( $P < 0,01$ ) y de los ácidos grasos de cadena corta hexanoico y heptanoico ( $P < 0,05$ ) fueron significativamente superiores en las muestras de grasa clasificadas con olor sexual por los miembros del panel test (Tabla 3.50). La concentración media de ácido octanoico no difirió significativamente según la valoración sensorial de las muestras de grasa, aunque presentó una mayor variabilidad que el resto de ácidos orgánicos identificados. Las concentraciones medias del 1-octen-3-ol y de la 2-heptanona fueron también significativamente superiores ( $P < 0,05$ , Tabla 3.50) en las muestras de grasa con defecto sensorial.

Tabla 3.45. Medias por mínimos cuadrados (X) y error típico (ET) de las concentraciones de 1,4-diclorobenceno y estireno (ng/g de grasa dorsal) en muestras de cerdos enteros con concentraciones bajas de escatol y androstenona (BB) y clasificadas según la valoración sensorial de los miembros del panel test. Análisis mediante *Head space* dinámico.

	BT <sup>1</sup>		C <sup>1</sup>		Significación <sup>2</sup>
	X	ET	X	ET	
1,4-diclorobenceno	502,46 <sup>a</sup>		145,48 <sup>b</sup>	52,68	**
estireno	99,35 <sup>a</sup>		15,85 <sup>b</sup>	5,95	***

<sup>1</sup> Clasificación de las muestras de grasa según el análisis sensorial. (BT) muestras con olor sexual; (C) muestras control

<sup>2</sup> Nivel de significación: \*\*\* (P<0,001); \*\* (P<0,01)

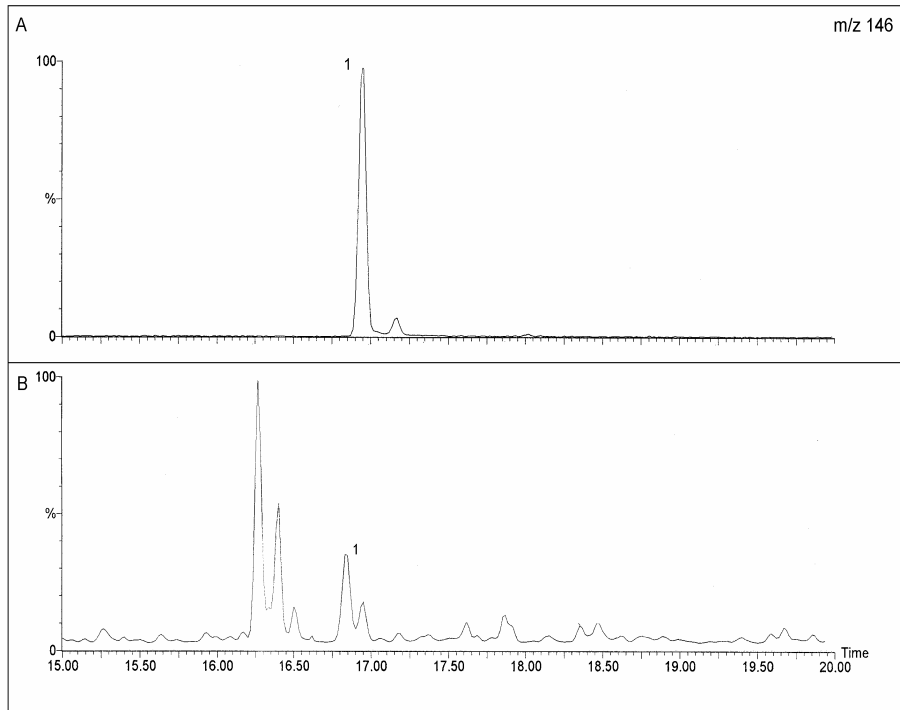
Tabla 3.46. Medias por mínimos cuadrados (X) y error típico (ET) de las concentraciones de indol y escatol (ng/g de grasa dorsal) en muestras de cerdos enteros con concentraciones altas de escatol (AA y AB) y clasificadas según la valoración sensorial de los miembros del panel test. Análisis mediante *Head space* dinámico.

	BT <sup>1</sup>		C <sup>1</sup>		Significación <sup>2</sup>
	X	ET	X	ET	
indol	36,92	9,66	10,94	11,96	NS
escatol	58,81 <sup>a</sup>	10,23	17,43 <sup>b</sup>	12,67	*

<sup>1</sup> Clasificación de las muestras de grasa según el análisis sensorial. (BT) muestras con olor sexual; (C) muestras control

<sup>2</sup> Nivel de significación: \* (P<0,05); NS: no significativa

1



2

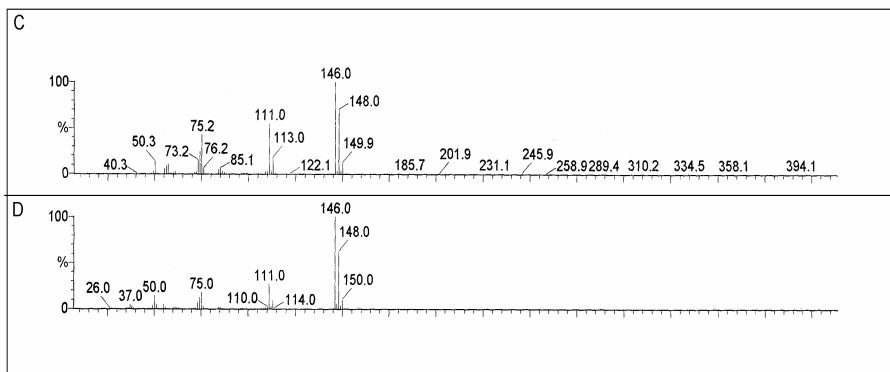


Figura 3.40. (1) Cromatogramas de GC-MS en modo *SCAN* del perfil de volátiles de una muestra de grasa dorsal de cerdo entero con concentraciones bajas de escatol y androstenona: *Head Space* dinámico. (A) selección del fragmento m/z 146 y (B) cromatograma de ion total. (2) (A) Comparación entre el espectro de masas del compuesto identificado como 1,4-diclorobenceno (C) en las muestras analizadas y el espectro de la librería espectral (B). Identificación de los picos: (1) 1,4-diclorobenceno



Tabla 3.47. Niveles de significación de las concentraciones (ng/g de grasa dorsal) de los aldehidos, ácidos, alcoholes y cetonas identificados en cerdos enteros y hembras. Análisis mediante técnicas de *Head Space* dinámico.

Familia	Compuestos	GRUPO <sup>1</sup>	PAÍS <sup>2</sup>	CLASE <sup>3</sup>	GRUPO <sup>1</sup> xCLASE <sup>3</sup>	PAÍS <sup>2</sup> xCLASE <sup>3</sup>
<i>Aldehidos</i>	hexanal	*	NS	NS	*	NS
	2-hexenal	**	NS	NS	**	NS
	heptanal	***	NS	*	***	NS
	2-heptenal	**	NS	NS	*	NS
	2,4-heptadienal	***	*	NS	***	NS
	octanal	***	NS	**	**	NS
	2-octenal	NS	*	NS	NS	NS
	nonanal	***	NS	**	***	NS
	2-nonenal	***	NS	NS	**	NS
	2,4-decadienal	***	NS	NS	*	NS
<i>Alcoholes</i>	1-octen-3-ol	**	NS	*	*	**
<i>Cetonas</i>	2-heptanona	***	NS	*	**	*
<i>Ácidos</i>	hexanoico	NS	NS	*	NS	NS
	heptanoico	NS	*	*	NS	NS
	octanoico	NS	NS	NS	NS	NS
	nonanoico	*	NS	NS	NS	NS

<sup>1</sup> Clasificación de las muestras de grasa según las concentraciones de escatol y androstenona determinadas mediante métodos rápidos. (BB) escatol bajo-androstenona baja; (BA) escatol bajo-androstenona alta; (MM) escatol medio:androstenona media; (AB) escatol alto-androstenona baja; (AA) escatol alto-androstenona alta

<sup>2</sup> País de procedencia de las canales analizadas. (DK) Dinamarca; (ES) España; (FR) Francia; (UK) Reino Unido; (NL) Holanda; SE (Suecia)

<sup>3</sup> Clasificación de las muestras de grasa según el análisis sensorial. (BT) muestras con olor sexual; (C) muestras control

Niveles de significación: \*\*\* (P<0,001); \*\* (P<0,01); \* (P<0,05); NS: no significativa

Tabla 3.48. Niveles de significación de las concentraciones (ng/g de grasa dorsal) de los hidrocarburos y compuestos derivados del benceno y del furano identificados en cerdos enteros y hembras. Análisis mediante técnicas de *Head Space* dinámico.

Familia	Compuestos	GRUPO <sup>1</sup>	PAÍS <sup>2</sup>	CLASE <sup>3</sup>	GRUPO <sup>1</sup> xCLASE <sup>3</sup>	PAÍS <sup>2</sup> xCLASE <sup>3</sup>
<i>Hidrocarburos</i>	hexano	NS	NS	*	NS	NS
	heptano	NS	NS	NS	NS	NS
	1-octeno	***	NS	NS	NS	NS
	2-octeno	***	NS	NS	*	NS
	3-metilheptano	**	NS	NS	NS	NS
	tetrametilbutano	NS	NS	NS	NS	NS
	pentametilheptano	NS	**	NS	NS	NS
	decano	**	NS	NS	NS	NS
	undecano	NS	NS	*	NS	*
	dodecano	**	NS	NS	NS	NS
<i>Derivados del benceno</i>	benceno	NS	NS	NS	NS	NS
	etilbenceno	*	**	NS	*	**
	xileno	***	NS	NS	**	NS
	tolueno	NS	NS	*	*	NS
	estireno	NS	NS	NS	**	NS
	benzaldehido	***	*	NS	***	***
<i>Otros</i>	furano-2-pentil	*	NS	NS	NS	NS

<sup>1</sup> Clasificación de las muestras de grasa según las concentraciones de escatol y androstenona determinadas mediante métodos rápidos. (BB) escatol bajo-androstenona baja; (BA) escatol bajo-androstenona alta; (MM) escatol medio:androstenona media; (AB) escatol alto-androstenona baja; (AA) escatol alto-androstenona alta

<sup>2</sup> País de procedencia de las canales analizadas. (DK) Dinamarca; (ES) España; (FR) Francia; (UK) Reino Unido; (NL) Holanda; SE (Suecia)

<sup>3</sup> Clasificación de las muestras de grasa según el análisis sensorial. (BT) muestras con olor sexual; (C) muestras control

Niveles de significación: \*\*\* (P<0,001); \*\* (P<0,01); \* (P<0,05); NS: no significativa

Tabla 3.49. Influencia del peso (kg) y porcentaje de magro de las canales en las concentraciones de los compuestos volátiles identificados en grasa dorsal porcina. Análisis mediante técnicas de *Head Space* dinámico.

	Peso Canal	% Magro
octanal	NS	*
nonanal	NS	*
2-nonenal	NS	**
2,4-decadienal	NS	*
1-octen-3-ol	NS	**
furano-2-pentil	NS	*
nonanoico	*	NS
hexano	**	NS
heptano	**	NS
undecano	**	NS

Nivel de significación: \*\* (P<0,01); \* (P<0,05); NS: no significativa

Tabla 3.50 . Medias por mínimos cuadrados (X) y error típico (ET) de las concentraciones de los aldehidos, ácidos, alcoholes y cetonas (ng/g de grasa dorsal) identificados en canales de cerdos enteros y hembras clasificadas según la valoración sensorial de los miembros del panel test. Análisis mediante técnicas de *Head Space* dinámico.

Familia	Compuesto	BT <sup>1</sup>		C <sup>1</sup>	
		X	ET	X	ET
<i>Aldehidos</i>	hexanal	1881,63	392,10	1172,17	401,53
	2-hexenal	40,45	8,91	32,25	9,12
	heptanal	266,35 <sup>a</sup>	44,52	123,52 <sup>b</sup>	45,59
	2-heptenal	191,90	33,27	145,81	34,07
	2,4-heptadienal	284,99	49,72	202,76	50,91
	octanal	140,09 <sup>a</sup>	14,36	75,09 <sup>b</sup>	14,71
	2-octenal	410,02	211,07	603,24	224,60
	nonanal	374,33 <sup>a</sup>	38,85	199,98 <sup>b</sup>	39,79
	2-nonenal	105,82	16,68	81,89	17,08
	2,4-decadienal	884,60	191,12	712,30	195,71
<i>Ácidos</i>	hexanoico	448,60 <sup>a</sup>	59,43	119,79 <sup>b</sup>	69,65
	heptanoico	54,05 <sup>a</sup>	9,45	17,66 <sup>b</sup>	10,05
	octanoico	447,94	105,93	213,68	112,72
	nonanoico	10,90	2,69	9,44	2,86
<i>Alcoholes</i>	1-octen-3-ol	170,09 <sup>a</sup>	14,48	113,75 <sup>b</sup>	15,45
<i>Cetonas</i>	2-heptanona	64,26 <sup>a</sup>	6,01	40,35 <sup>b</sup>	6,42

<sup>1</sup> Clasificación de las muestras de grasa según el análisis sensorial. (BT) muestras con olor sexual; (C) muestras control

Dentro de la familia de los hidrocarburos, la concentración media de hexano fue significativamente superior en las muestras de grasa que no presentaron olor sexual ( $P < 0,05$ , Tabla 3.51), mientras que el undecano presentó un contenido medio significativamente superior en las muestras de grasa clasificadas con olor sexual ( $P < 0,05$ , Tabla 3.51). El tolueno fue el único compuesto derivado del benceno que mostró una concentración media significativamente superior ( $P < 0,05$ , Tabla 3.51) en las muestras de grasa que no presentaron olor sexual según las valoraciones de un panel test.

Las concentraciones medias de los compuestos volátiles identificados en las muestras de grasa evaluadas en este estudio se presentan en la Tabla 3.52-Tabla 3.56, según los grupos de concentraciones de escatol y androstenona establecidos. En general, las concentraciones medias de los aldehídos cuantificados, excepto la del 2-octenal, fueron significativamente superiores en las muestras de grasa con concentraciones bajas de los compuestos relacionados con el olor sexual (grupo BB) (ver Tabla 3.52). Además, según se muestra en la Tabla 3.53, la concentración suma de los aldehídos identificados (en ng/g) sólo difirió significativamente ( $P < 0,01$ ) según la valoración sensorial del panel test en las muestras de grasa pertenecientes al grupo de concentraciones bajas de escatol y androstenona. De acuerdo con estos resultados, el perfil de volátiles obtenido en muestras de grasa dorsal de cerdo entero con concentraciones bajas de escatol y androstenona y olor sexual presentó una mayor proporción de aldehídos en comparación al perfil de volátiles obtenido en muestras pertenecientes al grupo control (Figura 3.41).

Las concentraciones medias de los ácidos grasos de cadena corta identificados en las muestras de grasa de cerdo con diferentes concentraciones de los compuestos relacionados con el olor sexual se muestran en la Tabla 3.54. El ácido nonanoico presentó un valor medio significativamente superior ( $P < 0,05$ ) en las muestras de grasa con concentraciones de escatol superiores a  $0,22 \mu\text{g/g}$  (grupos AA y AB). La concentración media de 1-octen-3-ol fue significativamente superior ( $P < 0,01$ ) en las muestras de grasa que presentaron, concentraciones medias de escatol y androstenona ( $0,11-0,21 \mu\text{g/g}$  y  $0,50-1,0 \mu\text{g/g}$ , respectivamente), según los resultados de métodos inespecíficos, mientras que las muestras pertenecientes a los grupos de concentraciones bajas y medias (BB y MM) presentaron una concentración media de 2-heptanona significativamente superior ( $P < 0,001$ ) al resto de grupos de concentraciones evaluados.

Tabla 3.51. Medias por mínimos cuadrados (X) y error típico (ET) de las concentraciones (ng/g de grasa dorsal) de los hidrocarburos y de los compuestos derivados del benceno y del furano identificados en canales de cerdos enteros y hembras clasificadas según valoración sensorial de los miembros del panel test. Análisis mediante técnicas de *Head Space* dinámico.

Familia	Compuesto	BT <sup>1</sup>		C <sup>1</sup>		
		X	ET	X	ET	
<i>Hidrocarburos</i>	hexano	253,50 <sup>b</sup>	54,16	421,60 <sup>a</sup>	57,63	
	heptano	142,50	54,13	192,26	57,60	
	1-octeno	131,53	16,96	169,19	18,04	
	2-octeno	97,31	12,74	133,96	13,04	
	3-metilheptano	80,59	22,03	127,29	23,44	
	tetrametilbutano	805,60	557,89	1439,49	593,65	
	pentametilheptano	1032,50	363,12	1371,02	386,39	
	decano	459,03	98,14	509,69	104,43	
	undecano	107,15 <sup>a</sup>	13,50	62,45 <sup>b</sup>	14,32	
	dodecano	89,39	16,47	73,20	17,52	
	<i>Derivados del benceno</i>	benceno	170,14	21,96	117,75	23,37
		etilbenceno	39,69	6,96	49,96	7,42
xileno		100,19	12,50	121,62	12,80	
tolueno		175,19 <sup>b</sup>	44,29	339,06 <sup>a</sup>	45,36	
estireno		61,46	5,56	55,95	5,69	
<i>Otros</i>	benzaldehido	150,70	19,01	165,52	20,29	
	furano-2-pentil	103,77	23,18	76,41	24,66	

<sup>1</sup> Clasificación de las muestras de grasa según el análisis sensorial. (BT) muestras con olor sexual; (C) muestras control

Tabla 3.52. Medias por mínimos cuadrados (X) y error típico (ET) de las concentraciones (ng/g de grasa dorsal) de los aldehidos identificados en canales de cerdos enteros y hembras clasificadas según los intervalos de concentraciones de escatol y androstenona considerados. Análisis mediante técnicas *de Head Space* dinámico.

	BB <sup>1</sup>		BA <sup>1</sup>		MM <sup>1</sup>		AB <sup>1</sup>		AA <sup>1</sup>		HEMBRAS	
	X	ET	X	ET	X	ET	X	ET	X	ET	X	ET
hexanal	3327,35 <sup>a</sup>	572,65	845,34 <sup>bc</sup>	685,63	2684,49 <sup>ab</sup>	646,25	984,66 <sup>bc</sup>	737,49	645,55 <sup>c</sup>	633,65	674,01 <sup>bc</sup>	728,54
2-hexenal	79,73 <sup>a</sup>	13,01	10,55 <sup>b</sup>	15,57	71,42 <sup>a</sup>	14,68	16,85 <sup>b</sup>	16,75	16,93 <sup>b</sup>	14,39	22,61 <sup>b</sup>	16,55
heptanal	567,05 <sup>a</sup>	65,02	111,57 <sup>b</sup>	77,85	220,30 <sup>b</sup>	73,38	89,06 <sup>b</sup>	83,74	88,97 <sup>b</sup>	71,95	92,67 <sup>b</sup>	82,72
2-heptenal	289,66 <sup>ab</sup>	48,59	104,37 <sup>c</sup>	58,18	345,52 <sup>a</sup>	54,84	120,09 <sup>bc</sup>	62,58	76,90 <sup>c</sup>	53,77	76,60 <sup>c</sup>	61,82
2,4-heptadienal	782,64 <sup>a</sup>	72,61	65,05 <sup>c</sup>	86,93	420,59 <sup>b</sup>	81,94	98,71 <sup>c</sup>	93,51	53,20 <sup>c</sup>	80,34	43,05 <sup>c</sup>	92,37
octanal	205,79 <sup>a</sup>	20,98	64,48 <sup>c</sup>	25,12	164,28 <sup>ab</sup>	23,68	99,58 <sup>bc</sup>	27,02	59,09 <sup>c</sup>	23,21	52,33 <sup>c</sup>	26,69
2-octenal	253,55	322,18	18,37	378,71	156,08	351,59	376,41	403,57	1018,98	346,60	53,12	411,59
nonanal	1010,76 <sup>a</sup>	56,74	92,31 <sup>c</sup>	67,94	363,17 <sup>b</sup>	64,04	76,93 <sup>c</sup>	73,08	104,12 <sup>c</sup>	62,79	75,65 <sup>c</sup>	72,19
2-nonenal	240,01 <sup>a</sup>	24,36	31,91 <sup>b</sup>	29,17	169,90 <sup>a</sup>	27,49	50,04 <sup>b</sup>	31,37	30,33 <sup>b</sup>	26,96	40,97 <sup>b</sup>	30,99
2,4-decadienal	2467,76 <sup>a</sup>	279,12	161,50 <sup>c</sup>	334,19	1374,20 <sup>b</sup>	314,99	307,66 <sup>c</sup>	359,46	314,41 <sup>c</sup>	308,85	165,18 <sup>c</sup>	355,11

<sup>1</sup>Clasificación de las muestras de grasa según las concentraciones de escatol y androstenona determinadas mediante métodos rápidos. (BB) escatol bajo-androstenona baja; (BA) escatol bajo-androstenona alta; (MM) escatol medio:androstenona media; (AB) escatol alto-androstenona baja; (AA) escatol alto-androstenona alta

Tabla 3.53. Medias por mínimos cuadrados (X) y error típico (ET) de las concentraciones totales (ng/g de grasa dorsal) de los aldehidos identificados en canales de cerdos enteros y hembras clasificadas según los intervalos de concentración de escatol y androstenona y según valoración sensorial de los miembros del panel test Análisis mediante técnicas de *Head Space* dinámico.

	BT <sup>1</sup>		C <sup>1</sup>		Significación <sup>3</sup>
	X	ET	X	ET	
BB <sup>2</sup>	15726,51 <sup>a</sup>	1706,38	4341,37 <sup>b</sup>	1869,25	**
BA <sup>2</sup>	1247,57	115,41	1421,43	133,26	NS
AB <sup>2</sup>	1645,52	98,40	1645,25	113,63	NS
AA <sup>2</sup>	1588,71	156,63	1204,04	221,50	NS
MM <sup>2</sup>	4486,77	802,46	7460,32	1035,98	NS
HEMBRAS	1941,98	342,13	1181,29	342,13	NS

<sup>1</sup> Clasificación de las muestras de grasa según el análisis sensorial. (BT) muestras con olor sexual; (C) muestras control

<sup>2</sup> Clasificación de las muestras de grasa según las concentraciones de escatol y androstenona determinadas mediante métodos rápidos. (BB) escatol bajo-androstenona baja; (BA) escatol bajo-androstenona alta; (MM) escatol medio:androstenona media; (AB) escatol alto-androstenona baja; (AA) escatol alto-androstenona alta

<sup>3</sup> Nivel de significación: \*\* (p<0,01); NS: no significativa



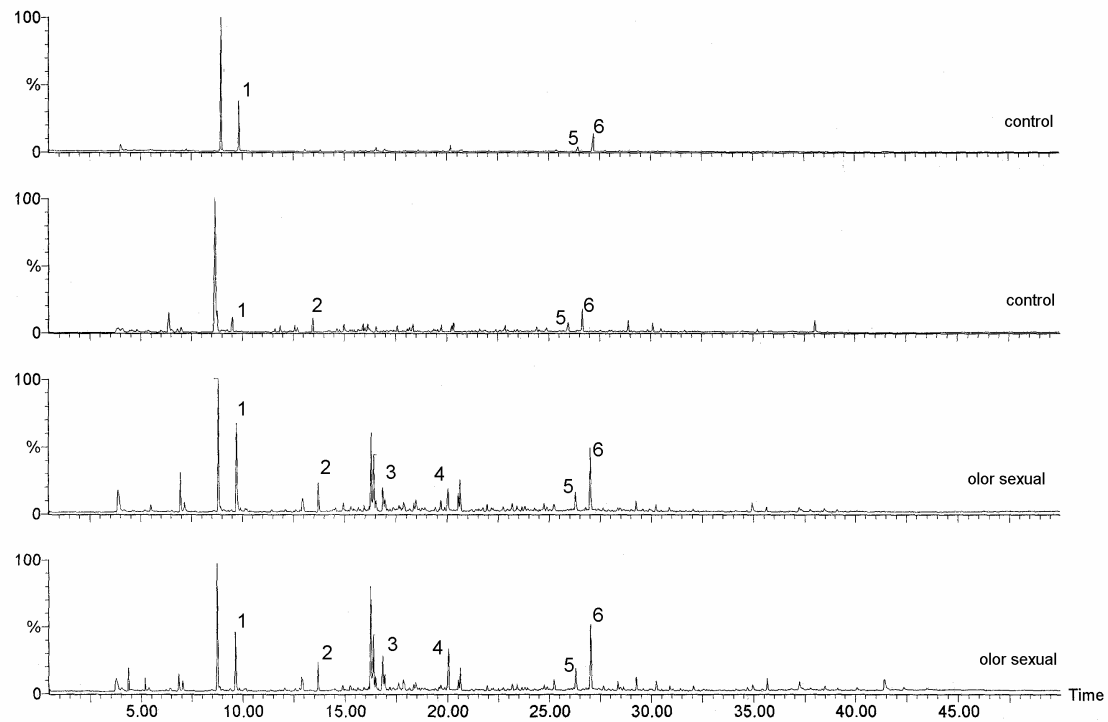


Figura 3.41. Comparación del perfil de volátiles obtenido mediante *Head Space* dinámico en muestras de grasa dorsal de cerdo entero con concentraciones bajas de escatol y androstenona y clasificadas según la valoración sensorial de los miembros del panel test. Identificación de los picos: (1) hexanal, (2) heptanal, (3) octanal, (4) nonanal, (5) 2-decenal y (6) 2,4-decadienal

Tabla 3.54. Medias por mínimos cuadrados (X) y error típico (ET) de las concentraciones (ng/g de grasa dorsal) de los ácidos, alcoholes y cetonas identificados en canales de cerdos enteros y hembras clasificadas según los intervalos de concentraciones de escatol y androstenona. Análisis mediante técnicas *de Head Space* dinámico.

	BB <sup>1</sup>		BA <sup>1</sup>		MM <sup>1</sup>		AB <sup>1</sup>		AA <sup>1</sup>		HEMBRAS	
	X	ET	X	ET	X	ET	X	ET	X	ET	X	ET
hexanoico	871,01	243,36	481,01	286,06	308,53	265,58	407,25	304,84	416,63	261,81	320,73	310,89
heptanoico	61,75	14,42	13,49	16,95	26,68	15,74	25,60	18,06	52,04	15,51	35,57	18,42
octanoico	759,70	161,69	169,44	190,06	241,09	176,45	358,18	202,54	105,38	173,95	351,07	206,57
nonanoico	10,99 <sup>b</sup>	4,10	5,29 <sup>b</sup>	4,83	5,55 <sup>b</sup>	4,48	12,84 <sup>ab</sup>	5,14	24,01 <sup>a</sup>	4,42	2,34 <sup>b</sup>	5,24
1-octen-3-ol	151,28 <sup>b</sup>	22,20	119,13 <sup>b</sup>	24,70	231,81 <sup>a</sup>	23,72	128,20 <sup>b</sup>	25,68	123,80 <sup>b</sup>	23,10	97,30 <sup>b</sup>	28,23
2-heptanona	85,48 <sup>a</sup>	9,22	43,45 <sup>b</sup>	10,26	96,46 <sup>a</sup>	9,85	21,94 <sup>b</sup>	10,66	46,21 <sup>b</sup>	9,59	20,31 <sup>b</sup>	11,73

<sup>1</sup>Clasificación de las muestras de grasa según las concentraciones de escatol y androstenona determinadas mediante métodos rápidos. (BB) escatol bajo-androstenona baja; (BA) escatol bajo-androstenona alta; (MM) escatol medio:androstenona media; (AB) escatol alto-androstenona baja; (AA) escatol alto-androstenona alta

Las concentraciones medias de los hidrocarburos identificados en muestras de grasa procedentes de canales de cerdos enteros y hembras y clasificadas según las concentraciones de los compuestos relacionados con el olor sexual se presentan en la Tabla 3.55. Las muestras de grasa con concentraciones medias de escatol y androstenona presentaron un contenido medio significativamente superior de 1-octeno ( $P < 0,001$ ), 2-octeno ( $P < 0,001$ ) y 3-metilheptano ( $P < 0,01$ ), mientras que las concentraciones medias de decano y dodecano fueron significativamente superiores en las muestras de grasa pertenecientes al grupo de concentraciones bajas de escatol y androstenona (BB) ( $P < 0,01$ ).

Las muestras de grasa con una mayor concentración de escatol y androstenona (grupo AA) presentaron un perfil de compuestos aromáticos derivados del benceno completamente distinto. Las concentraciones medias de xileno ( $P < 0,001$ ), benzaldehído ( $P < 0,001$ ) y etilbenceno ( $P < 0,05$ ) fueron significativamente superiores en todos los grupos de muestras que presentaron concentraciones elevadas de escatol o androstenona (grupos AA, AB y BA) (Tabla 3.56).

Las muestras de grasa dorsal analizadas presentaron un perfil de compuestos volátiles diferente según el país de procedencia de las canales. La concentración media de 2,4-heptadienal fue significativamente inferior en Francia, aunque comparable a la concentración media determinada en las canales procedentes de España ( $P < 0,05$ , Tabla 3.57). El contenido medio de 2-octenal fue significativamente superior ( $P < 0,05$ , Tabla 3.57) en Dinamarca y el Reino Unido. Estos dos países, junto a Holanda, presentaron unos valores medios de ácido heptanoico significativamente superiores ( $P < 0,05$ , Tabla 3.58) en comparación al resto de países europeos participantes. Las concentraciones de etilbenceno ( $P < 0,01$ ) y benzaldehído ( $P < 0,05$ ) fueron significativamente superiores en muestras de grasa dorsal procedentes de Dinamarca (ver Tabla 3.59), aunque comparables a las determinadas en las canales procedentes del Reino Unido y Holanda, respectivamente. Por último, el pentametilheptano fue el único hidrocarburo identificado que presentó diferencias significativas entre los países estudiados, observándose una mayor concentración en las muestras de grasa seleccionadas en el Reino Unido, Francia y España ( $P < 0,01$ , Tabla 3.60).

Tabla 3.55. Medias por mínimos cuadrados (X) y error típico (ET) de las concentraciones (ng/g de grasa dorsal) de los hidrocarburos identificados en canales de cerdos enteros y hembras clasificadas según los intervalos de concentraciones de escatol y androstenona. Análisis mediante técnicas *de Head Space* dinámico.

	BB <sup>1</sup>		BA <sup>1</sup>		MM <sup>1</sup>		AB <sup>1</sup>		AA <sup>1</sup>		HEMBRAS	
	X	ET	X	ET	X	ET	X	ET	X	ET	X	ET
hexano	337,34	82,67	355,44	97,17	223,97	90,21	387,83	103,55	362,29	88,93	358,42	105,61
heptano	365,35	82,63	32,90	97,12	258,75	90,17	89,01	103,50	140,53	88,89	117,76	105,56
1-octeno	79,40 <sup>c</sup>	25,88	141,46 <sup>bc</sup>	30,42	320,76 <sup>a</sup>	28,24	169,84 <sup>b</sup>	32,42	136,66 <sup>bc</sup>	27,84	54,06 <sup>c</sup>	33,06
2-octeno	68,15 <sup>bc</sup>	18,60	93,75 <sup>bc</sup>	22,27	268,27 <sup>a</sup>	20,99	122,40 <sup>b</sup>	23,96	89,15 <sup>bc</sup>	20,58	52,06 <sup>c</sup>	23,67
3-metilheptano	25,54 <sup>b</sup>	33,62	115,01 <sup>b</sup>	39,52	230,93 <sup>a</sup>	36,69	127,92 <sup>ab</sup>	42,11	102,88 <sup>b</sup>	36,17	21,38 <sup>b</sup>	42,95
tetrametilbutano	2619,51	851,57	131,31	1000,98	160,00	929,31	335,68	1066,69	1229,31	916,11	2259,48	1087,89
pentametilheptano	1113,49	554,26	944,61	651,50	1812,85	604,85	2256,53	694,28	1313,03	596,27	229,92	708,07
decano	986,57 <sup>a</sup>	149,80	464,84 <sup>bc</sup>	176,08	31,75 <sup>c</sup>	163,47	417,37 <sup>bc</sup>	187,64	709,68 <sup>ab</sup>	161,15	295,95 <sup>bc</sup>	191,37
Undecano	68,59	21,11	67,04	22,99	72,13	21,23	83,19	23,72	144,43	21,45	73,45	26,22
Dodecano	189,61 <sup>a</sup>	25,14	24,23 <sup>b</sup>	29,55	73,06 <sup>b</sup>	27,43	45,07 <sup>b</sup>	31,49	66,37 <sup>b</sup>	27,04	89,45 <sup>b</sup>	32,11

<sup>1</sup>Clasificación de las muestras de grasa según las concentraciones de escatol y androstenona determinadas mediante métodos rápidos. (BB) escatol bajo-androstenona baja; (BA) escatol bajo-androstenona alta; (MM) escatol medio:androstenona media; (AB) escatol alto-androstenona baja; (AA) escatol alto-androstenona alta

Tabla 3.56. Medias por mínimos cuadrados (X) y error típico (ET) de las concentraciones (ng/g de grasa dorsal) de los compuestos derivados del benceno y del furano identificados en canales de cerdos enteros y hembras clasificadas según los intervalos de concentraciones de escatol y androstenona. Análisis mediante técnicas *de Head Space* dinámico.

	BB <sup>1</sup>		BA <sup>1</sup>		MM <sup>1</sup>		AB <sup>1</sup>		AA <sup>1</sup>		HEMBRAS	
	X	ET	X	ET	X	ET	X	ET	X	ET	X	ET
benceno	97,21	33,52	154,62	39,40	211,02	36,58	148,34	42,00	152,73	36,06	99,75	42,82
etilbenceno	33,14 <sup>b</sup>	10,66	56,25 <sup>ab</sup>	11,86	46,26 <sup>ab</sup>	11,39	65,01 <sup>ab</sup>	12,33	68,34 <sup>a</sup>	11,09	0,03 <sup>c</sup>	13,56
xileno	75,13 <sup>c</sup>	18,25	137,98 <sup>b</sup>	21,86	24,16 <sup>c</sup>	20,60	167,24 <sup>ab</sup>	23,51	205,75 <sup>a</sup>	20,20	55,17 <sup>c</sup>	23,22
tolueno	206,46	64,69	297,38	77,45	212,39	73,00	363,13	83,31	398,14	71,58	65,23	82,30
estireno	60,63	8,12	68,44	9,72	44,71	9,17	55,83	10,46	72,28	8,99	50,35	10,33
benzaldehido	200,61 <sup>ab</sup>	29,15	213,56 <sup>ab</sup>	32,43	153,78 <sup>bc</sup>	31,14	103,88 <sup>cd</sup>	33,72	263,11 <sup>a</sup>	30,32	13,72 <sup>d</sup>	37,07
furano-2-pentil	130,17 <sup>ab</sup>	35,38	12,78 <sup>c</sup>	41,58	203,84 <sup>a</sup>	38,60	54,71 <sup>bc</sup>	44,31	59,41 <sup>bc</sup>	38,06	79,62 <sup>bc</sup>	45,19

<sup>1</sup>Clasificación de las muestras de grasa según las concentraciones de escatol y androstenona determinadas mediante métodos rápidos. (BB) escatol bajo-androstenona baja; (BA) escatol bajo-androstenona alta; (MM) escatol medio:androstenona media; (AB) escatol alto-androstenona baja; (AA) escatol alto-androstenona alta

Tabla 3.57. Medias por mínimos cuadrados (X) y error típico (ET) de las concentraciones (ng/g de grasa dorsal) de los aldehidos identificados en canales de cerdos enteros y hembras clasificadas según los países de procedencia. Análisis mediante técnicas de *Head Space* dinámico.

	DK <sup>1</sup>		ES <sup>1</sup>		FR <sup>1</sup>		UK <sup>1</sup>		NL <sup>1</sup>		SE <sup>1</sup>	
	X	ET	X	ET	X	ET	X	ET	X	ET	X	ET
hexanal	1530,09	605,84	1683,21	556,69	2139,19	862,18	1051,56	664,90	1017,63	726,06	1739,73	887,10
2-hexenal	34,00	13,76	32,82	12,65	29,86	19,58	53,81	15,10	27,14	16,49	40,46	20,15
heptanal	249,06	68,79	217,89	63,21	137,96	97,90	149,09	75,50	216,28	82,44	199,32	100,73
2-heptenal	152,45	51,41	182,37	47,24	197,19	73,16	127,65	56,42	153,13	61,61	200,34	75,27
2,4-heptadienal	377,32 <sup>a</sup>	76,82	213,70 <sup>ab</sup>	70,58	56,58 <sup>b</sup>	109,32	378,24 <sup>a</sup>	84,31	251,41 <sup>a</sup>	92,06	299,15 <sup>a</sup>	112,48
octanal	127,41	22,19	110,15	20,39	104,52	31,59	77,90	24,36	94,65	26,60	130,92	32,50
2-octenal	1081,77 <sup>a</sup>	324,48	75,07 <sup>b</sup>	308,60	340,21 <sup>ab</sup>	466,20	629,33 <sup>ab</sup>	360,78	182,89 <sup>b</sup>	400,68	103,72 <sup>b</sup>	422,69
nonanal	302,90	60,03	274,47	55,16	101,78	85,43	374,10	65,88	283,82	71,94	385,88	87,90
2-nonenal	91,65	25,77	98,35	23,68	62,98	36,68	97,73	28,29	78,49	30,89	133,95	37,74
2,4-decadienal	398,06	295,30	690,86	271,34	811,28	420,24	908,42	324,09	657,63	353,89	1324,46	432,39

<sup>1</sup> País de procedencia de las canales analizadas: (DK) Dinamarca; (ES) España; (FR) Francia; (UK) Reino Unido; (NL) Holanda; (SE) Suecia

Tabla 3.58. Medias por mínimos cuadrados (X) y error típico (ET) de las concentraciones (ng/g de grasa dorsal) de los ácidos orgánicos, alcoholes y cetonas identificados en canales de cerdos enteros y hembras clasificadas según los países de procedencia. Análisis mediante técnicas de *Head Space* dinámico.

	DK <sup>1</sup>		ES <sup>1</sup>		FR <sup>1</sup>		UK <sup>1</sup>		NL <sup>1</sup>		SE <sup>1</sup>	
	X	ET	X	ET	X	ET	X	ET	X	ET	X	ET
hexanoico	777,88	245,10	222,79	233,10	467,65	352,15	299,25	272,51	350,57	302,66	122,33	319,28
heptanoico	66,11 <sup>a</sup>	14,52	21,85 <sup>bc</sup>	13,81	11,97 <sup>bc</sup>	20,87	34,66 <sup>abc</sup>	16,15	68,79 <sup>ab</sup>	17,93	11,75 <sup>c</sup>	18,92
octanoico	722,96	162,85	279,27	154,88	373,21	233,97	319,96	181,06	397,80	201,09	338,08	212,13
nonanoico	10,05	4,13	10,68	3,93	6,55	5,94	11,86	4,60	5,60	5,11	16,28	5,39
1-octen-3-ol	126,60	21,82	113,93	19,15	221,87	29,67	114,73	35,63	131,32	26,24	143,07	30,93
2-heptanona	51,75	9,06	55,06	7,95	73,54	12,32	45,39	14,80	46,94	10,90	41,17	12,85

<sup>1</sup> País de procedencia de las canales analizadas: (DK) Dinamarca; (ES) España; (FR) Francia; (UK) Reino Unido; (NL) Holanda; (SE) Suecia

Tabla 3.59. Medias por mínimos cuadrados (X) y error típico (ET) de las concentraciones (ng/g de grasa dorsal) de los compuestos derivados del benceno y del furano identificados en canales de cerdos enteros y hembras clasificadas según los países de procedencia. Análisis mediante técnicas de *Head Space* dinámico.

	DK <sup>1</sup>		ES <sup>1</sup>		FR <sup>1</sup>		UK <sup>1</sup>		NL <sup>1</sup>		SE <sup>1</sup>	
	X	ET	X	ET	X	ET	X	ET	X	ET	X	ET
benceno	127,74	33,76	163,10	32,11	129,02	48,51	183,32	37,54	143,20	41,69	117,31	43,98
etilbenceno	84,29 <sup>a</sup>	10,48	25,39 <sup>b</sup>	9,20	36,59 <sup>b</sup>	14,25	53,43 <sup>ab</sup>	17,12	30,94 <sup>b</sup>	12,60	38,31 <sup>b</sup>	14,86
xileno	148,52	19,31	88,94	17,75	93,59	27,48	131,59	21,19	117,30	23,14	85,46	28,28
tolueno	238,73	68,44	258,29	62,88	91,37	97,39	378,68	75,11	255,29	82,02	320,38	100,21
estireno	54,80	8,59	59,81	7,90	52,30	12,23	81,97	9,43	56,52	10,30	46,82	12,58
Benzaldehido	258,59 <sup>a</sup>	28,65	120,99 <sup>b</sup>	25,15	112,87 <sup>b</sup>	38,96	112,65 <sup>b</sup>	46,79	190,96 <sup>ab</sup>	34,45	152,59 <sup>b</sup>	40,62
Furano-2-pentil	114,35	35,63	93,13	33,88	101,33	51,19	83,13	39,61	93,05	43,99	55,54	46,41

<sup>1</sup> País de procedencia de las canales analizadas: (DK) Dinamarca; (ES) España; (FR) Francia; (UK) Reino Unido; (NL) Holanda; (SE) Suecia



Tabla 3.60. Medias por mínimos cuadrados (X) y error típico (ET) de las concentraciones (ng/g de grasa dorsal) de los hidrocarburos identificados en canales de cerdos enteros y hembras clasificadas según los países de procedencia. Análisis mediante técnicas de *Head Space* dinámico.

	DK <sup>1</sup>		ES <sup>1</sup>		FR <sup>1</sup>		UK <sup>1</sup>		NL <sup>1</sup>		SE <sup>1</sup>	
	X	ET	X	ET	X	ET	X	ET	X	ET	X	ET
hexano	372,78	83,86	263,44	79,18	471,26	119,62	513,22	92,57	267,05	102,81	137,55	108,46
heptano	107,52	83,22	131,29	79,14	430,75	119,56	217,22	92,53	102,11	102,76	215,32	108,40
1-octeno	150,45	26,07	179,31	24,79	136,97	37,45	222,13	28,98	106,86	32,19	106,46	33,95
2-octeno	135,59	19,68	119,81	18,08	137,91	28,01	140,60	21,60	71,27	23,59	88,61	28,82
3-metilheptano	126,55	33,86	112,81	32,20	80,78	48,65	172,09	37,65	42,85	41,81	88,57	44,11
tetrametilbutano	360,11	857,65	466,19	815,66	3222,71	1232,24	2511,94	953,58	746,92	1059,06	572,57	1117,22
pentametilheptano	511,82 <sup>bc</sup>	558,22	1838,04 <sup>ab</sup>	530,89	1514,77 <sup>ac</sup>	802,02	3225,35 <sup>a</sup>	620,65	470,84 <sup>c</sup>	689,31	591,43 <sup>bc</sup>	727,16
decano	618,95	150,87	493,30	143,48	561,22	216,76	593,56	167,74	614,49	186,29	241,63	196,53
undecano	70,50	19,60	96,78	18,13	73,76	27,43	103,27	31,17	139,20	25,06	25,30	25,55
dodecano	53,32	25,32	110,23	24,08	123,99	36,37	99,85	28,15	94,72	31,26	51,68	32,98

<sup>1</sup> País de procedencia de las canales analizadas: (DK) Dinamarca; (ES) España; (FR) Francia; (UK) Reino Unido; (NL) Holanda; (SE) Suecia

Las concentraciones medias de los compuestos volátiles identificados en las muestras de grasa analizadas según el efecto de las interacciones Grupo x Clase y País x Clase se presentan en la Tabla 3.61-Tabla 3.70. Las concentraciones medias de los aldehidos identificados, a excepción del 2-octenal, fueron significativamente superiores en las muestras de grasa que presentaron concentraciones bajas de escatol y androstenona y clasificadas con olor sexual por los miembros de un panel test (Tabla 3.61 y Tabla 3.62). No obstante, las concentraciones medias de estos compuestos no mostraron diferencias significativas entre la valoración sensorial de las muestras en el resto de grupos de concentraciones de escatol y androstenona establecidos (AA, AB, BA, MM y hembras). Paralelamente, las concentraciones medias de 1-octen-3-ol ( $P<0,05$ ), 2-heptanona ( $P<0,01$ ) y estireno ( $P<0,01$ ) fueron también significativamente superiores en las muestras de grasa con concentraciones bajas de escatol y androstenona y evaluadas sensorialmente con olor sexual (Tablas Tabla 3.63 y Tabla 3.64).

Las concentraciones medias de tolueno ( $P<0,05$ ), xileno ( $P<0,01$ ) y benzaldehido ( $P<0,001$ ) difirieron significativamente según la evaluación sensorial de los panelistas en el grupo de muestras clasificadas con concentraciones elevadas de escatol y androstenona (AA) (Tabla 3.64). Asimismo, las concentraciones medias de xileno y benzaldehido fueron significativamente superiores en las muestras clasificadas sensorialmente con olor sexual y concentraciones bajas de escatol y androstenona (BB).

El perfil de los compuestos volátiles de los cerdos producidos en Francia, Dinamarca, Holanda y Suecia difirió significativamente según la valoración sensorial de las muestras. Respecto a las muestras control de cada país, las muestras evaluadas sensorialmente con olor sexual por los miembros de un panel test presentaron una mayor concentración de 1-octen-3-ol ( $P<0,01$ ) y 2-heptanona ( $P<0,05$ ) en Francia (Tabla 3.67) y de benzaldehido ( $P<0,001$ ) en Holanda (Tabla 3.68) y concentraciones inferiores de etilbenceno y benzaldehido en Dinamarca ( $P<0,01$  y  $P<0,001$ ) y de benzaldehido en Suecia ( $P<0,001$ ) (Tabla 3.68). En el resto de países participantes las concentraciones medias de los compuestos volátiles identificados no presentaron diferencias significativas entre las muestras de distinta evaluación sensorial.

Tabla 3.61. Interacción Grupo x Clase de las concentraciones (ng/g de grasa dorsal) de los aldehidos identificados en canales de cerdos enteros y hembras. Medias por mínimos cuadrados (X) y error típico (ET). Análisis mediante técnicas de *Head Space* dinámico

	hexanal		2-hexenal		heptanal		2-heptenal		2,4-heptadienal		octanal	
	X	ET	X	ET	X	ET	X	ET	X	ET	X	ET
BB <sup>1</sup> xC <sup>2</sup>	855,71 <sup>bc</sup>	838,26	18,11 <sup>c</sup>	19,04	160,36 <sup>b</sup>	95,18	84,34 <sup>cd</sup>	71,13	314,05 <sup>bcd</sup>	106,29	75,47 <sup>cd</sup>	30,71
BB <sup>1</sup> xBT <sup>2</sup>	5798,99 <sup>a</sup>	826,70	141,35 <sup>a</sup>	18,78	973,74 <sup>a</sup>	93,87	494,98 <sup>a</sup>	70,15	1251,23 <sup>a</sup>	104,82	336,10 <sup>a</sup>	30,29
BA <sup>1</sup> xC <sup>2</sup>	897,41 <sup>bc</sup>	1012,88	18,37 <sup>c</sup>	23,01	108,08 <sup>b</sup>	115,01	120,91 <sup>cd</sup>	85,95	150,70 <sup>cd</sup>	128,43	57,61 <sup>cd</sup>	37,11
BA <sup>1</sup> xBT <sup>2</sup>	793,28 <sup>bc</sup>	910,60	2,74 <sup>c</sup>	20,68	115,05 <sup>b</sup>	103,39	87,82 <sup>cd</sup>	77,27	20,60 <sup>d</sup>	115,46	71,36 <sup>cd</sup>	33,36
MM <sup>1</sup> xC <sup>2</sup>	3286,92 <sup>ab</sup>	1014,69	88,67 <sup>ab</sup>	23,05	244,48 <sup>b</sup>	115,21	412,78 <sup>ab</sup>	86,10	550,39 <sup>b</sup>	128,66	160,70 <sup>bc</sup>	37,17
MM <sup>1</sup> xBT <sup>2</sup>	2082,07 <sup>bc</sup>	787,60	54,17 <sup>bc</sup>	17,89	196,12 <sup>b</sup>	89,43	278,26 <sup>bc</sup>	66,83	290,79 <sup>bc</sup>	99,86	167,87 <sup>b</sup>	28,85
AB <sup>1</sup> xC <sup>2</sup>	1000,77 <sup>bc</sup>	1087,41	22,71 <sup>c</sup>	24,70	102,86 <sup>b</sup>	123,47	131,08 <sup>cd</sup>	92,27	135,64 <sup>cd</sup>	137,88	99,85 <sup>bcd</sup>	39,84
AB <sup>1</sup> xBT <sup>2</sup>	968,55 <sup>bc</sup>	914,29	11,01 <sup>c</sup>	20,77	75,25 <sup>b</sup>	103,81	109,11 <sup>cb</sup>	77,58	61,78 <sup>cd</sup>	115,93	99,31 <sup>bcd</sup>	33,49
AA <sup>1</sup> xC <sup>2</sup>	705,62 <sup>bc</sup>	1014,69	17,66 <sup>c</sup>	23,05	65,67 <sup>b</sup>	115,21	73,48 <sup>cd</sup>	86,10	26,43 <sup>cd</sup>	128,66	40,51 <sup>d</sup>	37,17
AA <sup>1</sup> xBT <sup>2</sup>	585,47 <sup>c</sup>	730,68	16,19 <sup>c</sup>	16,60	112,27 <sup>b</sup>	82,96	80,32 <sup>d</sup>	62,00	79,98 <sup>cd</sup>	92,65	77,67 <sup>cd</sup>	26,77
HEMBRASxC <sup>2</sup>	286,56 <sup>bc</sup>	1102,85	27,96 <sup>bc</sup>	25,05	59,65 <sup>b</sup>	125,22	52,27 <sup>cd</sup>	93,58	39,33 <sup>cd</sup>	139,84	16,43 <sup>d</sup>	40,40
HEMBRASxBT <sup>2</sup>	1061,45 <sup>bc</sup>	1072,69	17,25 <sup>c</sup>	24,37	125,69 <sup>b</sup>	121,80	100,93 <sup>cd</sup>	91,02	46,78 <sup>cd</sup>	136,01	88,24 <sup>bcd</sup>	39,30

<sup>1</sup> Clasificación de las muestras de grasa según las concentraciones de escatol y androstenona determinadas mediante métodos rápidos. (BB) escatol bajo-androstenona baja; (BA) escatol bajo-androstenona alta; (MM) escatol medio-androstenona media; (AB) escatol alto-androstenona baja; (AA) escatol alto-androstenona alta

<sup>2</sup> Clasificación de las muestras de grasa según el análisis sensorial. (BT) muestras con olor sexual; (C) muestras control

Tabla 3.62. Interacción Grupo x Clase de las concentraciones (ng/g de grasa dorsal) de los aldehídos identificados en canales de cerdos enteros y hembras. Medias por mínimos cuadrados (X) y error típico (ET). Análisis mediante técnicas de *Head Space* dinámico.

	nonanal		2-nonenal		2,4-decadienal	
	X	ET	X	ET	X	ET
BB <sup>1</sup> xC <sup>2</sup>	439,69 <sup>b</sup>	83,06	113,46 <sup>bcd</sup>	35,66	1442,46 <sup>bc</sup>	408,58
BB <sup>1</sup> xBT <sup>2</sup>	1581,83 <sup>a</sup>	81,92	366,55 <sup>a</sup>	35,17	3493,07 <sup>a</sup>	402,95
BA <sup>1</sup> xC <sup>2</sup>	125,80 <sup>cde</sup>	100,36	39,12 <sup>cd</sup>	43,09	101,87 <sup>d</sup>	493,70
BA <sup>1</sup> xBT <sup>2</sup>	58,83 <sup>e</sup>	90,23	24,70 <sup>d</sup>	38,74	221,12 <sup>cd</sup>	443,84
MM <sup>1</sup> xC <sup>2</sup>	394,45 <sup>bc</sup>	100,54	210,17 <sup>b</sup>	43,17	1914,82 <sup>b</sup>	494,58
MM <sup>1</sup> xBT <sup>2</sup>	331,89 <sup>bcd</sup>	78,04	129,64 <sup>bc</sup>	33,51	833,58 <sup>bcd</sup>	383,89
AB <sup>1</sup> xC <sup>2</sup>	84,02 <sup>de</sup>	107,75	52,02 <sup>cd</sup>	46,26	333,01 <sup>cd</sup>	530,02
AB <sup>1</sup> xBT <sup>2</sup>	69,84 <sup>e</sup>	90,60	48,05 <sup>cd</sup>	38,90	282,30 <sup>cd</sup>	445,64
AA <sup>1</sup> xC <sup>2</sup>	107,52 <sup>de</sup>	100,54	36,13 <sup>cd</sup>	43,17	386,82 <sup>cd</sup>	494,58
AA <sup>1</sup> xBT <sup>2</sup>	100,72 <sup>e</sup>	72,40	24,52 <sup>d</sup>	31,08	242,00 <sup>d</sup>	356,15
HEMBRASxC <sup>2</sup>	48,43 <sup>e</sup>	109,28	40,45 <sup>cd</sup>	46,92	94,80 <sup>d</sup>	537,55
HEMBRASxBT <sup>2</sup>	102,87 <sup>cde</sup>	106,29	41,48 <sup>cd</sup>	45,64	235,56 <sup>cd</sup>	522,85

<sup>1</sup>Clasificación de las muestras de grasa según las concentraciones de escatol y androstenona determinadas mediante métodos rápidos. (BB) escatol bajo-androstenona baja; (BA) escatol bajo-androstenona alta; (MM) escatol medio-androstenona media; (AB) escatol alto-androstenona baja; (AA) escatol alto-androstenona alta.

<sup>2</sup>Clasificación de las muestras de grasa según el análisis sensorial. (BT) muestras con olor sexual; (C) muestras control

Tabla 3.63. Interacción Grupo x Clase de las concentraciones (ng/g de grasa dorsal) de los ácidos, alcoholes y cetonas identificadas en canales de cerdos enteros y hembras. Medias por mínimos cuadrados (X) y error típico (ET). Análisis mediante técnicas de *Head Space* dinámico.

	hexanoico		heptanoico		octanoico		nonanoico		1-octen-3-ol		2-heptanona	
	X	ET	X	ET	X	ET	X	ET	X	ET	X	ET
BB <sup>1</sup> xC <sup>2</sup>	112,70	448,47	16,06	23,29	335,01	292,53	17,74	6,09	60,83 <sup>e</sup>	32,03	31,38 <sup>d</sup>	13,30
BB <sup>1</sup> xBT <sup>2</sup>	1413,35	430,49	92,67	22,35	1011,97	280,80	2,73	5,84	241,74 <sup>ab</sup>	30,75	139,59 <sup>a</sup>	12,77
BA <sup>1</sup> xC <sup>2</sup>	132,71	528,23	18,41	27,43	122,50	344,56	10,76	7,17	107,02 <sup>de</sup>	37,73	43,96 <sup>cd</sup>	15,67
BA <sup>1</sup> xBT <sup>2</sup>	15,71	446,45	19,74	23,18	128,77	291,22	1,10	6,06	131,24 <sup>cde</sup>	31,89	42,94 <sup>d</sup>	13,24
MM <sup>1</sup> xC <sup>2</sup>	242,48	531,56	23,54	27,60	180,84	346,73	1,38	7,21	255,32 <sup>a</sup>	37,97	85,74 <sup>bc</sup>	15,77
MM <sup>1</sup> xBT <sup>2</sup>	503,11	398,15	45,35	20,68	318,54	259,71	0,06	5,40	208,30 <sup>abc</sup>	28,44	107,17 <sup>b</sup>	11,81
AB <sup>1</sup> xC <sup>2</sup>	76,13	566,55	28,32	29,42	83,01	369,56	5,14	7,69	115,77 <sup>cde</sup>	40,47	16,02 <sup>d</sup>	16,81
AB <sup>1</sup> xBT <sup>2</sup>	137,21	442,82	25,08	22,99	463,55	288,85	14,30	6,01	140,63 <sup>cde</sup>	31,63	27,86 <sup>d</sup>	13,13
AA <sup>1</sup> xC <sup>2</sup>	51,25	531,56	19,56	27,60	3,04	346,73	5,93	7,21	88,05 <sup>de</sup>	37,97	43,78 <sup>d</sup>	15,77
AA <sup>1</sup> xBT <sup>2</sup>	90,91	368,29	89,59	19,13	262,95	240,23	36,91	5,00	159,54 <sup>bcd</sup>	26,31	48,63 <sup>cd</sup>	10,92
HEMBRASxC <sup>2</sup>	341,23	593,90	24,70	30,84	621,96	387,39	0,67	8,06	55,53 <sup>e</sup>	42,42	21,24 <sup>d</sup>	17,62
HEMBRASxBT <sup>2</sup>	288,71	521,87	32,74	27,10	134,59	340,41	2,77	7,08	139,07 <sup>cde</sup>	37,27	19,38 <sup>d</sup>	15,48

<sup>1</sup>Clasificación de las muestras de grasa según las concentraciones de escatol y androstenona determinadas mediante métodos rápidos. (BB) escatol bajo-androstenona baja; (BA) escatol bajo-androstenona alta; (MM) escatol medio-androstenona media; (AB) escatol alto-androstenona baja; (AA) escatol alto-androstenona alta

<sup>2</sup>Clasificación de las muestras de grasa según el análisis sensorial. (BT) muestras con olor sexual; (C) muestras control

Tabla 3.64. Interacción Grupo x Clase de las concentraciones (ng/g de grasa dorsal) de los derivados del benceno y del furano identificados en canales de cerdos enteros y hembras. Medias por mínimos cuadrados (X) y error típico (ET). Análisis mediante técnicas de *Head Space* dinámico.

	tolueno		xileno		etilbenceno		benceno		estireno		furano-2-pentil		benzaldehido	
	X	ET	X	ET	X	ET	X	ET	X	ES	X	ET	X	ET
BB <sup>1</sup> xC <sup>2</sup>	247,76 <sup>bc</sup>	94,69	35,21 <sup>d</sup>	26,72	18,58 <sup>de</sup>	15,39	48,62	56,61	22,94 <sup>d</sup>	11,89	20,21	58,15	114,03 <sup>def</sup>	42,06
BB <sup>1</sup> xBT <sup>2</sup>	165,15 <sup>c</sup>	93,39	115,04 <sup>c</sup>	26,35	47,70 <sup>abcd</sup>	14,77	186,25	54,35	98,32 <sup>a</sup>	11,72	230,61	55,82	287,18 <sup>ab</sup>	40,37
BA <sup>1</sup> xC <sup>2</sup>	363,01 <sup>abc</sup>	114,42	139,59 <sup>bc</sup>	32,29	60,58 <sup>abcd</sup>	18,12	173,16	66,68	67,72 <sup>abc</sup>	14,37	29,26	68,49	269,22 <sup>abc</sup>	49,54
BA <sup>1</sup> xBT <sup>2</sup>	231,77 <sup>c</sup>	102,86	136,36 <sup>bc</sup>	29,03	51,93 <sup>abcd</sup>	15,32	161,28	56,36	69,16 <sup>abc</sup>	12,91	47,52	57,89	157,90 <sup>cde</sup>	41,87
MM <sup>1</sup> xC <sup>2</sup>	129,58 <sup>c</sup>	114,62	11,84 <sup>d</sup>	32,34	72,20 <sup>abc</sup>	18,24	89,48	67,10	32,18 <sup>cd</sup>	14,39	267,54	68,92	100,14 <sup>def</sup>	49,85
MM <sup>1</sup> xBT <sup>2</sup>	295,20 <sup>bc</sup>	88,97	36,48 <sup>d</sup>	25,11	20,31 <sup>de</sup>	13,66	295,07	50,26	57,24 <sup>bc</sup>	11,17	187,45	51,62	207,43 <sup>bcd</sup>	37,34
AB <sup>1</sup> xC <sup>2</sup>	564,35 <sup>ab</sup>	122,84	209,75 <sup>ab</sup>	34,66	91,69 <sup>a</sup>	19,44	115,60	71,52	60,39 <sup>abcd</sup>	15,42	79,26	73,46	166,47 <sup>bcddef</sup>	53,13
AB <sup>1</sup> xBT <sup>2</sup>	161,92 <sup>c</sup>	103,28	124,72 <sup>bc</sup>	29,14	38,30 <sup>bcd</sup>	15,19	157,59	55,90	51,27 <sup>bcd</sup>	12,97	66,22	57,42	41,29 <sup>fg</sup>	41,53
AA <sup>1</sup> xC <sup>2</sup>	651,72 <sup>a</sup>	114,62	285,98 <sup>a</sup>	32,34	82,07 <sup>ab</sup>	18,24	163,13	67,10	85,07 <sup>ab</sup>	14,39	59,69	68,92	388,15 <sup>a</sup>	49,85
AA <sup>1</sup> xBT <sup>2</sup>	144,56 <sup>c</sup>	82,54	125,51 <sup>c</sup>	23,29	54,61 <sup>abcd</sup>	12,64	138,19	46,49	59,49 <sup>bc</sup>	10,36	80,76	47,75	138,06 <sup>def</sup>	34,54
HEMBRASxC <sup>2</sup>	77,93 <sup>c</sup>	124,58	47,31 <sup>cd</sup>	35,15	-25,37 <sup>e</sup>	20,37	78,50	74,97	67,43 <sup>abc</sup>	15,64	59,72	77,01	44,93 <sup>g</sup>	55,70
HEMBRASxBT <sup>2</sup>	52,52 <sup>c</sup>	121,17	63,03 <sup>cd</sup>	34,19	25,31 <sup>cde</sup>	17,90	61,92	65,88	33,26 <sup>cd</sup>	15,21	105,24	67,67	72,36 <sup>efg</sup>	48,94

<sup>1</sup>Clasificación de las muestras de grasa según las concentraciones de escatol y androstenona determinadas mediante métodos rápidos. (BB) escatol bajo-androstenona baja; (BA) escatol bajo-androstenona alta; (MM) escatol medio-androstenona media; (AB) escatol alto-androstenona baja; (AA) escatol alto-androstenona alta

<sup>2</sup>Clasificación de las muestras de grasa según el análisis sensorial. (BT) muestras con olor sexual; (C) muestras control

Tabla 3.65. Interacción Grupo x Clase de las concentraciones (ng/g de grasa dorsal) de los hidrocarburos identificados en canales de cerdos enteros y hembras. Medias por mínimos cuadrados (X) y error típico (ET). Análisis mediante técnicas de *Head Space* dinámico.

	hexano		heptano		1-octeno		2-octeno		3-metilheptano		tetrametilbutano		pentametilheptano	
	X	ET	X	ET	X	ET	X	ET	X	ET	X	ET	X	ET
BB <sup>1</sup> xC <sup>2</sup>	566,98	150,76	424,84	156,29	75,72	41,79	72,81 <sup>c</sup>	27,23	13,38	58,42	3951,72	1565,98	2522,02	978,47
BB <sup>1</sup> xBT <sup>2</sup>	283,12	144,72	371,75	150,03	102,21	40,12	63,50 <sup>c</sup>	26,86	34,38	56,08	2071,22	1503,21	444,87	939,25
BA <sup>1</sup> xC <sup>2</sup>	245,17	177,58	104,46	184,09	156,26	49,22	83,41 <sup>c</sup>	32,90	152,32	68,82	722,36	1844,52	612,81	1152,51
BA <sup>1</sup> xBT <sup>2</sup>	378,21	150,09	67,22	155,59	166,01	41,60	104,09 <sup>bc</sup>	29,58	126,97	58,16	33,66	1558,95	511,84	974,09
MM <sup>1</sup> xC <sup>2</sup>	318,48	178,70	364,48	185,26	407,90	49,53	356,69 <sup>a</sup>	32,96	318,14	69,25	860,17	1856,13	1220,04	1159,77
MM <sup>1</sup> xBT <sup>2</sup>	225,11	133,85	245,50	138,76	280,57	37,10	179,86 <sup>b</sup>	25,59	176,99	51,87	2017,24	1390,27	1964,18	868,69
AB <sup>1</sup> xC <sup>2</sup>	546,01	190,46	132,03	197,45	193,44	52,80	140,00 <sup>bc</sup>	35,32	160,74	73,81	864,29	1978,32	978,77	1236,12
AB <sup>1</sup> xBT <sup>2</sup>	294,31	148,86	38,09	154,33	161,45	41,27	104,81 <sup>bc</sup>	29,70	102,12	57,69	186,05	1546,26	2768,14	966,15
AA <sup>1</sup> xC <sup>2</sup>	494,57	178,70	147,50	185,25	136,89	49,53	105,27 <sup>bc</sup>	32,96	97,51	69,25	1031,11	1856,13	1430,85	1159,77
AA <sup>1</sup> xBT <sup>2</sup>	191,66	123,81	85,09	128,35	105,53	34,32	73,03 <sup>c</sup>	23,74	85,67	47,98	499,20	1286,03	1055,71	803,55
HEMBRASxC <sup>2</sup>	556,37	199,65	290,68	206,98	18,16	55,34	45,57 <sup>c</sup>	35,83	-36,45	77,37	3297,27	2073,80	1716,70	1295,78
HEMBRASxBT <sup>2</sup>	330,74	175,44	37,20	181,88	69,40	48,63	58,56 <sup>c</sup>	34,85	8,05	67,99	2169,07	1822,30	1376,94	1138,63

<sup>1</sup>Clasificación de las muestras de grasa según las concentraciones de escatol y androstenona determinadas mediante métodos rápidos. (BB) escatol bajo-androstenona baja; (BA) escatol bajo-androstenona alta; (MM) escatol medio-androstenona media; (AB) escatol alto-androstenona baja; (AA) escatol alto-androstenona alta

<sup>2</sup>Clasificación de las muestras de grasa según el análisis sensorial. (BT) muestras con olor sexual; (C) muestras control

Tabla 3.66. Interacción Grupo x Clase de las concentraciones (ng/g de grasa dorsal) de los hidrocarburos identificados en canales de cerdos enteros y hembras. Medias por mínimos cuadrados (X) y error típico (ET). Análisis mediante técnicas de *Head Space* dinámico.

	decano		undecano		dodecano	
	X	ET	X	ET	X	ET
BB <sup>1</sup> xC <sup>2</sup>	908,86	257,80	53,12	30,75	202,22	42,66
BB <sup>1</sup> xBT <sup>2</sup>	1302,66	247,47	77,48	29,52	243,88	40,95
BA <sup>1</sup> xC <sup>2</sup>	267,36	303,66	46,07	36,22	0,84	50,25
BA <sup>1</sup> xBT <sup>2</sup>	771,97	256,65	81,69	30,62	42,04	42,47
MM <sup>1</sup> xC <sup>2</sup>	51,82	305,57	57,54	36,45	65,72	50,57
MM <sup>1</sup> xBT <sup>2</sup>	142,91	228,88	79,33	27,30	86,34	37,88
AB <sup>1</sup> xC <sup>2</sup>	745,16	325,68	91,87	38,85	20,28	53,90
AB <sup>1</sup> xBT <sup>2</sup>	259,34	254,56	77,14	30,37	53,57	42,13
AA <sup>1</sup> xC <sup>2</sup>	954,06	305,57	73,12	36,45	8,82	50,57
AA <sup>1</sup> xBT <sup>2</sup>	561,56	211,71	200,27	25,27	85,30	35,04
HEMBRASxC <sup>2</sup>	384,02	341,40	51,39	40,73	179,66	56,50
HEMBRASxBT <sup>2</sup>	238,98	299,99	82,99	35,79	41,24	49,65

<sup>1</sup>Clasificación de las muestras de grasa según las concentraciones de escatol y androstenona determinadas mediante métodos rápidos. (BB) escatol bajo-androstenona baja; (BA) escatol bajo-androstenona alta; (MM) escatol medio-androstenona media; (AB) escatol alto-androstenona baja; (AA) escatol alto-androstenona alta

<sup>2</sup>Clasificación de las muestras de grasa según el análisis sensorial. (BT) muestras con olor sexual; (C) muestras control



Tabla 3.67. Interacción País x Clase de las concentraciones (ng/g de grasa dorsal) de 1-octen-3-ol y 2-heptanona en canales de cerdos enteros y hembras. Medias por mínimos cuadrados (X) y error típico (ET). Análisis mediante técnicas de *Head Space* dinámico.

	1-octen-3-ol		2-heptanona	
	X	ET	X	ET
DK <sup>1</sup> x C <sup>2</sup>	143,21 <sup>b</sup>	24,71	57,57 <sup>b</sup>	14,94
DK <sup>1</sup> x BT <sup>2</sup>	109,99 <sup>b</sup>	35,98	45,92 <sup>b</sup>	10,26
ES <sup>1</sup> x C <sup>2</sup>	132,27 <sup>b</sup>	29,98	55,84 <sup>b</sup>	12,45
ES <sup>1</sup> x BT <sup>2</sup>	95,59 <sup>b</sup>	23,84	54,27 <sup>b</sup>	9,90
FR <sup>1</sup> x C <sup>2</sup>	92,45 <sup>b</sup>	40,01	25,39 <sup>b</sup>	16,61
FR <sup>1</sup> x BT <sup>2</sup>	351,30 <sup>a</sup>	43,83	121,70 <sup>a</sup>	18,20
UK <sup>1</sup> x C <sup>2</sup>	89,88 <sup>b</sup>	68,12	30,96 <sup>b</sup>	28,29
UK <sup>1</sup> x BT <sup>2</sup>	139,57 <sup>b</sup>	20,95	59,82 <sup>b</sup>	8,70
NL <sup>1</sup> x C <sup>2</sup>	97,20 <sup>b</sup>	29,16	33,64 <sup>b</sup>	12,12
NL <sup>1</sup> x BT <sup>2</sup>	165,45 <sup>b</sup>	43,61	60,24 <sup>b</sup>	18,11
SE <sup>1</sup> x C <sup>2</sup>	160,73 <sup>b</sup>	38,40	38,71 <sup>b</sup>	15,95
SE <sup>1</sup> x BT <sup>2</sup>	125,41 <sup>b</sup>	48,51	43,64 <sup>b</sup>	20,15

<sup>1</sup>Clasificación de las muestras de grasa según el país de procedencia de las canales. (DK) Dinamarca; (ES) España; (FR) Francia; (UK) Reino Unido; (NL) Holanda; (SE) Suecia

<sup>2</sup> Clasificación de las muestras de grasa según el análisis sensorial. (BT) muestras con olor sexual; (C) muestras control

Tabla 3.68. Interacción País x Clase de las concentraciones (ng/g de grasa dorsal) de los derivados del benceno y del furano identificados en canales de cerdos enteros y hembras. Medias por mínimos cuadrados (X) y error típico (ET). Análisis mediante técnicas de *Head Space* dinámico.

	tolueno		xileno		etilbenceno		benceno		estireno		furano-2-pentil		benzaldehido	
	X	ET	X	ET	X	ET	X	ET	X	ET	X	ET	X	ET
DK <sup>1</sup> x C <sup>2</sup>	533,87	113,91	222,08	33,70	129,27 <sup>a</sup>	17,28	160,68	63,60	68,09	16,03	89,69	65,32	405,91 <sup>a</sup>	47,25
DK <sup>1</sup> x BT <sup>2</sup>	56,56	78,21	110,34	23,14	39,32 <sup>bc</sup>	11,87	95,29	43,67	52,47	11,01	107,84	44,85	111,28 <sup>d</sup>	32,44
ES <sup>1</sup> x C <sup>2</sup>	199,73	94,93	83,12	28,09	15,69 <sup>c</sup>	14,40	114,59	53,01	59,57	13,36	136,02	54,43	103,26 <sup>cd</sup>	39,37
ES <sup>1</sup> x BT <sup>2</sup>	265,68	75,49	91,92	22,33	35,09 <sup>c</sup>	11,45	231,82	42,14	63,02	10,63	83,09	43,29	138,71 <sup>bcd</sup>	31,31
FR <sup>1</sup> x C <sup>2</sup>	122,79	126,65	76,72	37,47	32,25 <sup>bc</sup>	19,22	67,98	70,71	34,08	17,83	89,07	72,63	54,06 <sup>d</sup>	52,53
FR <sup>1</sup> x BT <sup>2</sup>	80,46	138,75	92,26	41,05	40,92 <sup>bc</sup>	21,05	134,22	77,47	63,80	19,53	195,90	79,56	171,69 <sup>bcd</sup>	57,55
UK <sup>1</sup> x C <sup>2</sup>	379,32	215,64	118,97	63,80	39,78 <sup>bc</sup>	32,72	91,33	120,39	60,94	30,35	66,69	123,66	73,68 <sup>bcd</sup>	89,44
UK <sup>1</sup> x BT <sup>2</sup>	310,29	66,33	121,97	19,63	67,08 <sup>b</sup>	10,06	217,97	37,03	85,51	9,34	95,64	38,04	151,62 <sup>bcd</sup>	27,51
NL <sup>1</sup> x C <sup>2</sup>	282,94	92,42	113,34	27,35	19,40 <sup>c</sup>	14,02	128,09	51,60	58,03	13,01	44,31	53,01	117,78 <sup>cd</sup>	38,33
NL <sup>1</sup> x BT <sup>2</sup>	218,43	138,06	136,68	40,85	42,48 <sup>bc</sup>	20,95	164,80	77,08	55,63	19,43	132,37	79,17	264,14 <sup>ab</sup>	57,26
SE <sup>1</sup> x C <sup>2</sup>	505,41	121,57	105,04	35,97	63,35 <sup>bc</sup>	18,45	105,82	67,87	35,91	17,11	89,90	69,71	238,40 <sup>bc</sup>	50,42
SE <sup>1</sup> x BT <sup>2</sup>	159,12	153,56	79,75	45,44	13,27 <sup>bc</sup>	23,30	156,19	85,73	58,54	21,62	102,94	88,06	66,78 <sup>d</sup>	63,69

<sup>1</sup>Clasificación de las muestras de grasa según el país de procedencia de las canales. (DK) Dinamarca; (ES) España; (FR) Francia; (UK) Reino Unido; (NL) Holanda; (SE) Suecia

<sup>2</sup>Clasificación de las muestras de grasa según el análisis sensorial. (BT) muestras con olor sexual; (C) muestras control

Tabla 3.69. Interacción País x Clase de las concentraciones (ng/g de grasa dorsal) de los hidrocarburos identificados en canales de cerdos enteros y hembras. Medias por mínimos cuadrados (X) y error típico (ET). Análisis mediante técnicas de *Head Space* dinámico.

	hexano		heptano		1-octeno		2-octeno		3-metilheptano		tetrametilbutano		pentametilheptano	
	X	ET	X	ET	X	ET	X	ET	X	ET	X	ET	X	ET
DK <sup>1</sup> x C <sup>2</sup>	491,98	169,36	106,66	175,57	233,65	46,95	159,98	37,58	233,89	65,63	748,87	1759,13	496,33	1099,16
DK <sup>1</sup> x BT <sup>2</sup>	253,50	116,28	48,37	120,55	102,65	32,23	111,45	25,81	67,09	45,06	10,61	1207,80	337,03	754,67
ES <sup>1</sup> x C <sup>2</sup>	258,52	141,13	119,38	146,31	189,28	39,12	149,37	31,32	120,49	54,69	87,89	1465,91	1720,60	915,95
ES <sup>1</sup> x BT <sup>2</sup>	233,71	112,23	133,25	116,35	167,07	31,11	97,17	24,91	96,27	43,49	532,23	1165,72	1989,91	728,38
FR <sup>1</sup> x C <sup>2</sup>	630,00	188,29	609,80	195,20	177,73	52,20	167,88	41,79	116,17	72,97	5004,90	1955,83	1314,33	1222,07
FR <sup>1</sup> x BT <sup>2</sup>	249,08	206,29	223,34	213,86	108,92	57,18	98,85	45,78	61,01	79,94	362,95	2142,72	926,59	1338,84
UK <sup>1</sup> x C <sup>2</sup>	911,33	320,60	353,64	332,37	154,89	88,87	130,67	71,15	53,98	124,24	3855,31	3330,12	4986,73	2080,77
UK <sup>1</sup> x BT <sup>2</sup>	395,88	98,61	199,37	102,23	205,46	27,34	124,54	21,88	160,98	38,22	2143,46	1024,32	2949,60	640,03
NL <sup>1</sup> x C <sup>2</sup>	385,95	137,41	148,60	142,45	97,04	38,09	75,12	30,49	21,97	53,25	1283,82	1427,28	506,64	891,81
NL <sup>1</sup> x BT <sup>2</sup>	250,43	205,25	123,61	212,79	137,80	56,90	86,68	45,55	78,45	79,54	892,65	2131,99	884,34	1332,14
SE <sup>1</sup> x C <sup>2</sup>	49,79	180,74	83,02	187,37	135,77	50,10	112,05	40,11	159,14	70,04	1698,59	1877,34	543,44	1173,02
SE <sup>1</sup> x BT <sup>2</sup>	320,57	228,31	116,92	236,68	163,27	63,29	81,34	50,67	70,39	88,47	883,67	2371,43	49,02	1481,75

<sup>1</sup> Clasificación de las muestras de grasa según el país de procedencia de las canales. (DK) Dinamarca; (ES) España; (FR) Francia; (UK) Reino Unido; (NL) Holanda; (SE) Suecia

<sup>2</sup> Clasificación de las muestras de grasa según el análisis sensorial. (BT) muestras con olor sexual; (C) muestras control

Tabla 3.70. Interacción País x Clase de las concentraciones (ng/g de grasa dorsal) de los hidrocarburos identificados en canales de cerdos enteros y hembras. Medias por mínimos cuadrados (X) y error típico (ET). Análisis mediante técnicas de *Head Space* dinámico.

	decano		undecano		dodecano	
	X	ET	X	ET	X	ET
DK <sup>1</sup> x C <sup>2</sup>	844,10	289,60	64,85 <sup>bc</sup>	32,68	79,47	47,92
DK <sup>1</sup> x BT <sup>2</sup>	358,50	198,84	76,15 <sup>bc</sup>	22,24	20,84	32,90
ES <sup>1</sup> x C <sup>2</sup>	521,23	241,33	73,85 <sup>bc</sup>	28,01	115,80	39,94
ES <sup>1</sup> x BT <sup>2</sup>	502,87	191,91	119,72 <sup>b</sup>	22,83	126,81	31,76
FR <sup>1</sup> x C <sup>2</sup>	525,71	321,98	54,93 <sup>bc</sup>	34,36	94,87	53,28
FR <sup>1</sup> x BT <sup>2</sup>	753,14	352,75	92,60 <sup>bc</sup>	40,55	137,12	58,37
UK <sup>1</sup> x C <sup>2</sup>	784,48	548,23	103,26 <sup>abc</sup>	58,31	155,13	90,72
UK <sup>1</sup> x BT <sup>2</sup>	566,10	168,63	103,28 <sup>bc</sup>	19,91	110,52	27,91
NL <sup>1</sup> x C <sup>2</sup>	553,57	234,97	42,60 <sup>c</sup>	25,68	108,04	38,88
NL <sup>1</sup> x BT <sup>2</sup>	827,28	350,98	235,80 <sup>a</sup>	40,95	110,99	58,08
SE <sup>1</sup> x C <sup>2</sup>	82,18	309,06	35,22 <sup>c</sup>	30,58	75,77	51,14
SE <sup>1</sup> x BT <sup>2</sup>	269,54	390,40	15,39 <sup>c</sup>	43,66	46,08	64,61

<sup>1</sup>Clasificación de las muestras de grasa según el país de procedencia de las canales. (DK) Dinamarca; (ES) España; (FR) Francia; (UK) Reino Unido; (NL) Holanda; (SE) Suecia

<sup>2</sup> Clasificación de las muestras de grasa según el análisis sensorial. (BT) muestras con olor sexual; (C) muestras control

Los compuestos volátiles identificados presentaron diversas correlaciones significativas, de las que se describen las más destacables. Las concentraciones de los ácidos orgánicos, aldehidos, 1-octen-3-ol, 2-heptanona y furano-2-pentil se correlacionaron significativamente con el porcentaje de magro de las canales (Tabla 3.71 y Tabla 3.72). Los aldehidos y ácidos grasos de cadena corta identificados, a excepción del ácido nonanoico y del octenal, se correlacionaron con la 2-heptanona, el 1-octen-3-ol y furano-2-pentil, compuestos que además se correlacionaron entre sí. La 2-heptanona también se correlacionó con el 2-octeno, estireno y benzaldehido (Tabla 3.72 y Tabla 3.73).

Los derivados del octeno (1-octeno y 2-octeno) se correlacionaron con el etilbenceno y furano-2-pentil, mientras el 2-octeno se correlacionó con 1-octeno y 1-octen-3-ol. El benceno y los compuestos derivados evaluados (tolueno, etilbenceno, p-xileno, estireno y benzaldehido) se correlacionaron significativamente entre sí, a excepción del benceno que no se correlacionó con el etil-benceno y benzaldehido. Sin embargo, el benceno también se correlacionó con 3-metilheptano, undecano, heptanopentametil y 1-octeno. Los derivados del benceno, a excepción del estireno, se correlacionaron con el 2-octenal, mientras el estireno y benzaldehido se correlacionaron con el nonanal. Además, el tolueno y el estireno se correlacionaron respectivamente con el ácido octanoico y con el heptanal y heptadienal.

Los hidrocarburos alifáticos presentaron diversas correlaciones con los compuestos volátiles identificados. El heptano, decano y dodecano se correlacionaron entre sí y además se correlacionaron con butanotetrametil y hexano, a excepción del dodecano que no se correlacionó con hexano. Los hidrocarburos alifáticos decano y dodecano se correlacionaron con el ácido hexanoico y con los aldehidos estudiados, excepto el hidrocarburo decano que no se correlacionó con el heptenal y decadienal y el hidrocarburo dodecano que no se correlacionó con el octenal. Por otra parte, el dodecano también se correlacionó con la 2-heptanona y con el furano-2-pentil, mientras el decano se correlacionó con el ácido octanoico y algunos derivados del benceno (etilbenceno, p-xileno y benzaldehido).

La mayoría de los compuestos volátiles identificados no se correlacionaron significativamente con los compuestos relacionados con el olor sexual, a

excepción del ácido nonanoico, del hexenal, nonenal y del undecano que se correlacionaron con la concentración de escatol (Tabla 3.73).

El análisis de componentes principales de los compuestos volátiles cuantitativamente más relevantes identificados en muestras de grasa dorsal de cerdo con concentraciones bajas y altas de escatol y androstenona (BB y AA) mediante Head Space dinámico se presentan en la Figura 3.42. La correlación descrita entre las concentraciones de los aldehidos y ácidos grasos de cadena corta se aprecia en la Figura 3.42 (A), así como entre las concentraciones de 2-heptanona y 1-octen-3-ol.

Los compuestos de mayor relevancia en el eje del componente 2 fueron los ácidos grasos de cadena corta, el 1,4-diclorobenceno, la 2-heptanona, el estireno, el 1-octen-3-ol y, por último, el hexanal y heptanal en las muestras de grasa pertenecientes al grupo de concentraciones bajas de escatol y androstenona. La disposición de las muestras de grasa sobre los ejes reflejó que las muestras clasificadas con olor sexual según los resultados del panel test presentaban concentraciones superiores de los compuestos volátiles considerados (ácidos grasos de cadena corta, aldehidos, 1,4-diclorobenceno) en comparación a las muestras de grasa que no presentaron defecto sensorial. La variabilidad determinada en el componente 1 (70,15%) permitió diferenciar las muestras de grasa que presentaron olor sexual de las muestras control. Por otra parte, la variabilidad determinada en el eje del componente 2 (19,95%) reflejó diferencias entre las muestras de grasa con olor sexual en función de las concentraciones de los compuestos volátiles identificados.

Las concentraciones suma de los ácidos grasos de cadena corta (hexanoico, heptanoico, octanoico y nonanoico), de los aldehidos (hexanal, heptanal, octanal, nonanal) y de los compuestos derivados del benceno (benceno, etilbenceno, p-xileno) se consideraron como una única variable en las muestras de grasa con concentraciones elevadas de escatol y androstenona, debido al número limitado de muestras de grasa en este grupo de concentraciones. Las correlaciones descritas entre las concentraciones de los compuestos aromáticos derivados del benceno y las concentraciones del benzaldehido y del tolueno se aprecian en la Figura 3.42 (B). Los compuestos de mayor relevancia en el eje del componente 1 fueron los aldehidos, los ácidos grasos de cadena corta, los compuestos aromáticos derivados del benceno, el benzaldehido, el tolueno y el 1-octen-3-ol

en las muestras de grasa pertenecientes al grupo de concentraciones altas de escatol y androstenona. Además, la concentración suma de indol y escatol contribuyó, junto a los demás compuestos indicados, en la determinación de la varianza del eje del componente 1.

La disposición de las muestras de grasa sobre los ejes indicó que la ausencia de olor sexual en las muestras de grasa se asocia a la presencia de benzaldehído, tolueno y de los compuestos aromáticos derivados del benceno, mientras que las muestras con olor sexual presentan una mayor concentración suma de aldehídos, ácidos grasos de cadena corta, escatol e indol y un mayor contenido de 1-octen-3-ol. Según estos resultados, la variabilidad determinada en el eje del componente 1 (47,90%) permite explicar la presencia o ausencia de olor sexual en las muestras de grasa evaluadas.

Tabla 3.71. Coeficientes de correlación de *Pearson* entre las concentraciones de los ácidos y aldehidos identificados en muestras de grasa dorsal de cerdos enteros y hembras. Análisis mediante técnicas de *Head Space* dinámico.

	% magro	hexanoico	heptanoico	octanoico	nonanoico	hexanal	hexenal	heptanal	heptenal	octanal	heptadienal	octenal	nonanal	nonenal	decadienal
% magro	1,0000														
hexanoico	0,4232**	1,0000													
heptanoico	0,3611*	0,6691***	1,0000												
octanoico	0,4147**	0,9163***	0,6928***	1,0000											
nonanoico	-0,0553	-0,1032	0,2134	0,0670	1,0000										
hexanal	0,4522**	0,8456***	0,4868***	0,7042***	-0,1851	1,0000									
hexenal	0,4321**	0,7672***	0,4374**	0,6837***	-0,2071	0,8303***	1,0000								
heptanal	0,4722***	0,8668***	0,6266***	0,7744***	-0,1405	0,9287***	0,8167***	1,0000							
heptenal	0,4203**	0,7519***	0,4771***	0,6122***	-0,2178	0,9133***	0,8378***	0,8268***	1,0000						
octanal	0,5357***	0,7305***	0,5554***	0,6322***	-0,1102	0,8911***	0,7219***	0,9005***	0,8464***	1,0000					
2,4-heptadienal	0,456**	0,7235***	0,5239***	0,6553***	-0,1849	0,7342***	0,8548***	0,8437***	0,7271***	0,7855***	1,0000				
octenal	0,3738**	0,1180	0,1235	0,0662	-0,1137	0,1268	0,1206	0,1570	0,1041	0,0623	0,1150	1,0000			
nonanal	0,4601**	0,6561***	0,4523**	0,5866***	-0,1587	0,7581***	0,7929***	0,873***	0,6965***	0,8381***	0,9403***	0,1293	1,0000		
nonenal	0,4975***	0,6583***	0,3857**	0,5562***	-0,2370	0,8536***	0,8366***	0,8482***	0,8534***	0,8832***	0,8613***	0,1148	0,8998***	1,0000	
2,4-decadienal	0,3372**	0,1424	0,0659	0,1114	-0,1411	0,4727***	0,4918***	0,5132***	0,4917***	0,6404***	0,6415***	0,0729	0,7864***	0,7906***	1,0000

Nivel de significación: \*\*\* (P<0,001); \*\* (P<0,01); \* (P<0,05)



Tabla 3.72. Coeficientes de correlación de *Pearson* entre las concentraciones de los hidrocarburos, alcoholes, cetonas, compuestos derivados del benceno y del furano identificados en muestras de grasa dorsal de cerdos enteros y hembras. Análisis mediante técnicas de *Head Space* dinámico.

	% magro	benceno	tolueno	etilbenceno	p-xileno	2-heptanona	estireno	benzaldehido	1-octen-3-ol	furano-2-pentil	hexano	butano tetrametil	heptano	3-metil heptano	1-octeno	2-octeno	heptano pentametil	decano	undecano	dodecano	
% magro	1,0000																				
benceno	-0,1831	1,0000																			
tolueno	-0,0805	0,3594*	1,0000																		
etilbenceno	0,0679	0,2828	0,3569*	1,0000																	
p-xileno	0,1519	0,2905*	0,5819***	0,5738***	1,0000																
2-heptanona	0,4002**	0,2752	-0,1414	0,0960	-0,0271	1,0000															
estireno	0,1022	0,5087***	0,2938*	0,3849**	0,5472***	0,3559*	1,0000														
benzaldehido	0,2827	0,2621	0,5515***	0,4867***	0,6378***	0,4457**	0,3682*	1,0000													
1-octen-3-ol	0,3543*	0,0597	-0,1172	0,0607	-0,0730	0,7821***	0,2114	0,2543	1,0000												
furano-2-pentil	0,4322**	0,1074	-0,2076	0,0906	-0,0465	0,7103***	0,1779	0,1727	0,8357***	1,0000											
hexano	-0,0264	-0,1030	0,0824	0,0563	0,1945	-0,1130	0,0974	0,0295	-0,1886	-0,0823	1,0000										
butano tetrametil	-0,0026	-0,2094	-0,0627	-0,0814	-0,1297	-0,0828	-0,0446	-0,1103	-0,1331	-0,0685	0,7193***	1,0000									
heptano	0,0850	-0,1258	-0,1861	-0,0616	-0,2397	0,2625	-0,1102	-0,0475	0,1718	0,2696	0,6357***	0,8389***	1,0000								
3-metil heptano	-0,0159	0,3095*	0,0275	0,4965***	-0,1071	0,2186	-0,0213	0,0179	0,1172	0,2194	-0,0710	-0,1989	0,0178	1,0000							
1-octeno	-0,0727	0,4239**	0,0692	0,4326**	-0,1004	0,2737	-0,0389	0,0175	0,2320	0,3649*	0,0178	-0,0808	0,1863	0,8971***	1,0000						
2-octeno	0,1062	0,1611	-0,0970	0,2997*	-0,2073	0,4155**	-0,1404	0,0409	0,3782**	0,4973***	0,0384	-0,0719	0,2359	0,8157***	0,8709***	1,0000					
heptano pentametil	-0,2771	0,5418***	0,1532	0,1074	0,0335	-0,0203	0,1110	-0,0928	-0,1162	-0,0833	0,2560	0,2414	0,2732	0,1419	0,3343*	0,1214	1,0000				
decano	0,3549*	-0,1239	0,1737	0,2876*	0,4809***	0,2311	0,2384	0,4412**	0,1637	0,2323	0,3199*	0,3492*	0,4233**	-0,2479	-0,1482	-0,1871	0,0269	1,0000			
undecano	-0,0832	0,3282*	0,0930	0,2645	0,3005*	-0,1093	0,1490	0,1115	0,0348	0,0823	-0,2112	-0,1094	-0,1684	-0,0930	0,0108	-0,1580	0,2356	0,1844	1,0000		
dodecano	0,2012	0,0121	-0,1294	-0,0549	-0,1166	0,3371*	0,0852	0,0325	0,2623	0,3413*	0,2079	0,5083***	0,6472***	-0,1918	0,0125	-0,0827	0,2553	0,6558***	0,1595	1,0000	

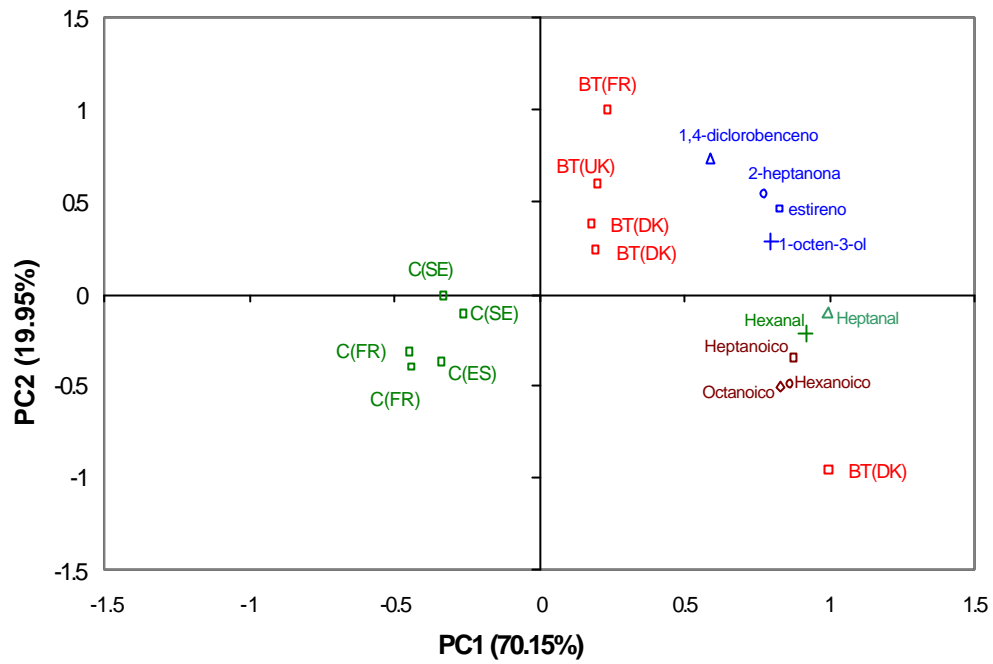
Nivel de significación: \*\*\* (P<0,001); \*\* (P<0,01); \* (P<0,05)

Tabla 3.73. Coeficientes de correlación de *Pearson* entre las concentraciones (ng/g de grasa dorsal) de los compuestos identificados en muestras de grasa dorsal de cerdos enteros y hembras. Análisis mediante técnicas de *Head Space* dinámico.

	hexanoico	heptanoico	octanoico	nonanoico	hexanal	hexenal	heptanal	heptenal	octanal	heptadienal	octenal	nonanal	nonenal	decadienal	escatol
escatol	-0,2038	0,2739	-0,0726	0,6246***	-0,2697	-0,2931*	-0,2104	-0,2501	-0,1643	-0,2514	-0,0481	-0,2721	-0,3084*	-0,2425	1,0000
benceno	-0,0391	-0,0031	-0,1347	-0,0625	0,0210	-0,0981	-0,0114	-0,0351	0,0876	-0,1038	0,0224	-0,0646	-0,0617	-0,1038	0,0691
tolueno	-0,2159	-0,1812	-0,3186*	-0,1983	-0,2182	-0,1844	-0,1919	-0,1482	-0,1633	-0,0810	0,3749**	-0,0816	-0,0466	0,0413	-0,0026
etilbenceno	0,0308	0,1563	-0,0063	-0,0910	0,0342	0,0686	0,0889	-0,0058	0,0482	0,0950	0,4121**	0,0365	-0,0005	-0,0261	0,0633
p-xileno	0,0885	0,2503	0,0327	-0,0466	-0,0088	-0,0784	0,1129	-0,0822	-0,0229	-0,0175	0,5902***	-0,0236	-0,1213	-0,2112	0,1682
2-heptanona	0,4261**	0,3021*	0,3095*	-0,1935	0,6739***	0,6208***	0,6365***	0,7237***	0,7376***	0,5537***	0,2421	0,6311***	0,6884***	0,5585***	-0,2471
estireno	0,2704	0,2650	0,1681	-0,1627	0,2248	0,2441	0,3344*	0,1767	0,2605	0,2941*	0,1104	0,3197*	0,2138	0,0849	-0,0564
benzaldehido	0,0852	0,2066	-0,0295	-0,2251	0,1689	0,1611	0,2631	0,2043	0,2255	0,2387	0,7928***	0,2918*	0,2587	0,2784	-0,1066
1-octen-3-ol	0,4953***	0,4057**	0,3755**	-0,1744	0,7441***	0,6519***	0,6198***	0,8654***	0,7725***	0,5195***	0,1043	0,5458***	0,7253***	0,5315***	-0,1485
furano-2-pentil	0,6954***	0,5031***	0,5473***	-0,1330	0,8614***	0,7189***	0,7161***	0,8684***	0,7799***	0,5558***	0,1387	0,5246***	0,7151***	0,3245*	-0,1838
hexano	-0,0115	-0,1338	-0,0868	-0,2127	-0,0645	-0,0553	-0,0717	-0,1241	-0,1988	-0,0880	0,1738	-0,0891	-0,1195	-0,1701	-0,1417
butano tetrametil	-0,0101	-0,1165	-0,0759	-0,1430	0,0084	0,1202	0,0066	-0,0559	-0,0831	0,0861	-0,0259	0,1157	0,0754	0,1291	-0,1527
heptano	0,1854	-0,0169	0,1018	-0,1493	0,3181*	0,3452*	0,2445	0,2663	0,2059	0,2521	0,0113	0,2886*	0,3089*	0,2657	-0,2207
3-metil heptano	-0,0790	-0,1082	-0,1297	-0,1086	0,0021	0,0231	-0,1166	0,0516	0,0378	-0,0341	-0,0419	-0,1345	-0,0043	-0,0861	-0,0661
1-octeno	-0,0156	-0,1210	-0,1110	-0,1575	0,1334	0,1237	-0,0571	0,1807	0,0970	-0,0014	-0,0086	-0,1176	0,0604	-0,0715	-0,0837
2-octeno	0,0823	-0,0342	-0,0059	-0,2037	0,2532	0,2187	0,0708	0,3691*	0,2313	0,1061	0,0265	-0,0168	0,2009	0,0341	-0,1717
heptano pentametil	-0,1205	-0,1692	-0,0888	0,0599	-0,0536	-0,1551	-0,1485	-0,1275	-0,0911	-0,2097	-0,0607	-0,1692	-0,1290	-0,0842	0,0937
decano	0,3336*	0,2827	0,3079*	-0,0424	0,4079**	0,3953**	0,4788***	0,2536	0,2918*	0,3234**	0,4726***	0,4219**	0,3522*	0,2848	-0,0502
undecano	-0,0143	0,5228***	0,0227	0,3897**	-0,0331	-0,1038	0,0121	-0,0556	-0,0075	-0,1371	0,0130	-0,1448	-0,1531	-0,1795	0,6068***
dodecano	0,2939*	0,1310	0,2710	-0,0665	0,4931***	0,5379***	0,4622**	0,3676*	0,3751**	0,4138**	0,0293	0,5157***	0,5095***	0,4821***	-0,1364

Nivel de significación: \*\*\* (P<0,001); \*\* (P<0,01); \* (P<0,05)

A



B

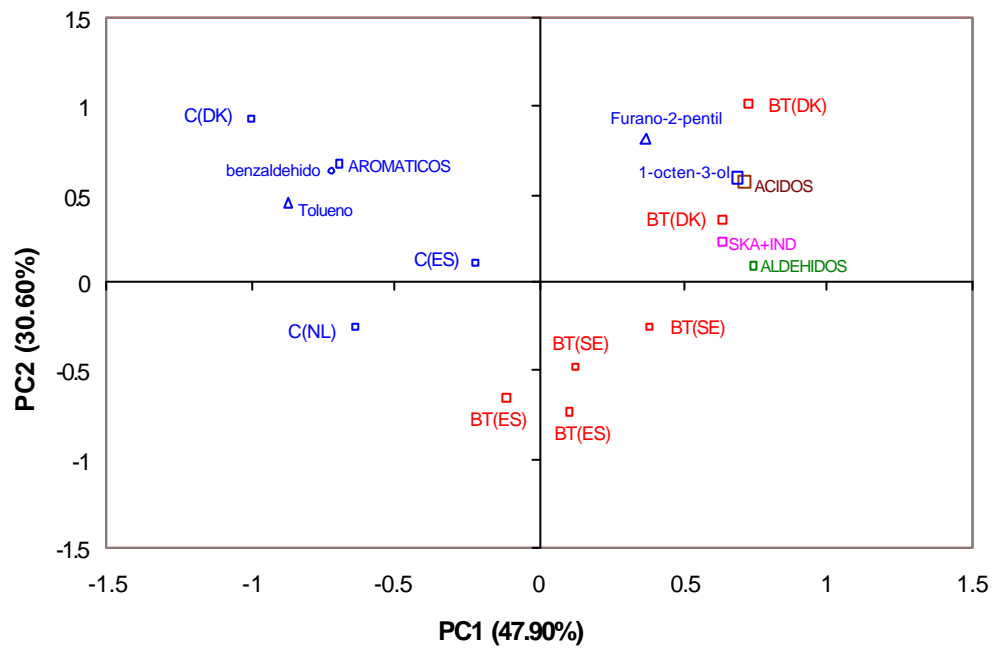


Figura 3.42. Análisis de componentes principales de los compuestos volátiles identificados en muestras de grasa dorsal de cerdo entero con concentraciones (A) bajas y (B) altas de escatol y androstenona

### 3.5. Aplicación de la metodología de extracción en fase sólida en las muestras de grasa dorsal de cerdo entero con concentraciones bajas de escatol y androstenona (grupo BB)

Las muestras de grasa dorsal clasificadas con olor sexual por los miembros de un panel test y un test de consumidores y con concentraciones bajas de escatol y androstenona ( $<0,10 \mu\text{g/g}$  y  $<0,50 \mu\text{g/g}$ , respectivamente) se purificaron mediante la metodología descrita en el apartado 2.3.3.2 para evaluar la presencia de otros posibles compuestos que pudieran contribuir al desarrollo del defecto sensorial.

Sin embargo, los extractos finales obtenidos en las fracciones eluidas presentaron una cantidad residual de ácidos grasos y triglicéridos que dificultaron la interpretación de los cromatogramas obtenidos, dado que se eluían a los mismos tiempos de retención que los compuestos relacionados con el olor sexual.

La presencia de indol y escatol no se detectó en el análisis cromatográfico por HPLC-FN y detección por fluorescencia de la primera fracción aminopropilsilica por la elevada cantidad de picos eluidos junto a estos compuestos.

Los compuestos detectados en el análisis cromatográfico mediante GC-MS de la segunda fracción aminopropilsilica, fracción en la que se recuperó la androstenona, correspondieron básicamente a hidrocarburos. Aunque el objetivo principal del procedimiento de purificación efectuado no era la determinación de la concentración de androstenona en muestras de grasa dorsal se procedió a su cuantificación. La selección de los fragmentos de  $m/z$  272 y  $m/z$  274 fue necesaria para la detección de la androstenona y de su patrón interno ( $5\alpha$ -androstan-3-ona), respectivamente. La concentración media de androstenona no presentó diferencias significativas entre las muestras pertenecientes al grupo control y al grupo de muestras clasificadas con olor sexual según los resultados de un panel test (Tabla 3.74).

El análisis cromatográfico mediante GC-MS de la cuarta y quinta fracción eluidas de la columna de sílica reveló una presencia elevada de ácidos grasos en su forma de trimetilsilil derivados. La detección de los androstenoles en estas fracciones no fue posible en ninguna de las muestras analizadas, aunque si se detectó la presencia del patrón interno utilizado ( $5\alpha$ -androstan- $3\alpha$ -ol). No obstante, el resultado más significativo del procedimiento de purificación realizado fue la

detección de un derivado carboxílico del indol: el ácido 2-indolcarboxílico (2-ICA) en su forma derivatizada. La concentración media de este compuesto fue significativamente superior ( $P < 0,01$ ) en las muestras de grasa dorsal clasificadas con olor sexual (Tabla 3.75), aunque presentaran concentraciones bajas de escatol y androstenona. Los valores de concentración de este compuesto en las muestras de grasa evaluadas son sólo indicativos, dado que la cuantificación se realizó respecto al patrón interno de los androstenoles. La comparación del espectro de masas obtenido por impacto electrónico del pico identificado en las muestras de grasa dorsal de cerdo entero como el derivado trimetilsilil del ácido 2-indolcarboxílico y el espectro de masas facilitado por la librería espectral se presenta en la Figura 3.43.

Tabla 3.74. Media por mínimos cuadrados (X) y error típico (ET) de la concentración (ng/g) de androstenona en grasa dorsal de cerdos enteros con concentraciones bajas de escatol y androstenona. Extracción en fase sólida con columnas de sílica. Análisis mediante GC-MS.

	BT <sup>1</sup>		C <sup>1</sup>		Significación <sup>2</sup>
	X	ET	X	ET	
5 $\alpha$ -androst-16-en-3-ona	293,30	100,34	188,10	100,34	NS

<sup>1</sup>Clasificación de las muestras de grasa según el análisis sensorial. (BT) muestras de grasa con olor sexual; (C) muestras de grasa control

<sup>2</sup>Nivel de significación. NS: no significativa

Tabla 3.75. Media por mínimos cuadrados (X) y error típico (ET) de la concentración (ng/g) del ácido 2-indolcarboxílico (TMS) en grasa dorsal de cerdos enteros con concentraciones bajas de escatol y androstenona (BB). Extracción en fase sólida con columnas de sílica. Análisis mediante GC-MS.

	BT <sup>1</sup>		C <sup>1</sup>		Significación <sup>3</sup>
	X	ET	X	ET	
2-ICA (TMS) <sup>2</sup>	293,30 <sup>a</sup>	100,34	188,10 <sup>b</sup>	100,34	**

<sup>1</sup>Clasificación de las muestras de grasa según el análisis sensorial. (BT) muestras de grasa con olor sexual; (C) muestras de grasa control

<sup>2</sup> 2-ICA (TMS): ácido 2-indolcarboxílico trimetilsilil derivado

<sup>3</sup>Nivel de significación. \*\* (P<0,01)

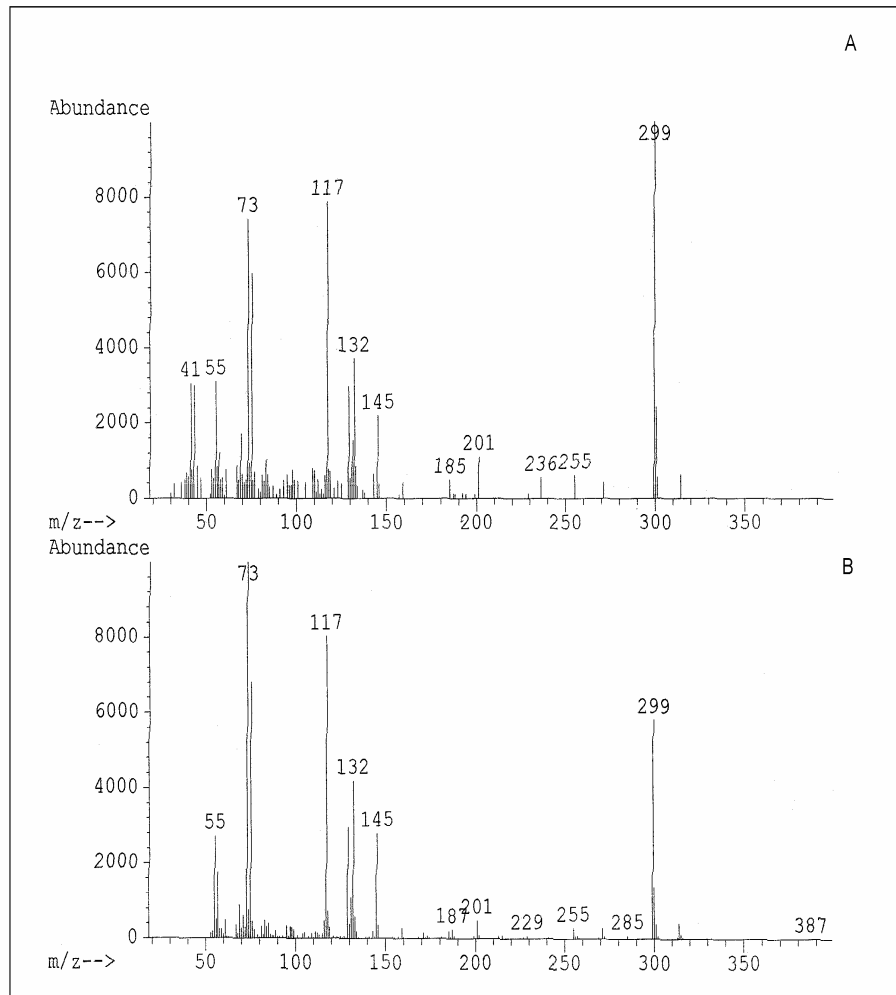


Figura 3.43. (A) Espectro de masas del pico identificado en la purificación de muestras de grasa dorsal de cerdo entero con concentraciones bajas de escatol y androstenona (cuarta fracción eluida de una columna de sílica) como ácido 2-indolcarboxílico. (B) Espectro de masas del ácido 2-indolcarboxílico obtenido en la librería espectral

### 3.6. Aplicación de la metodología de filtración de gel en muestras de grasa dorsal de cerdo entero con concentraciones bajas de escatol y androstenona (grupo BB)

La cromatografía de filtración de gel permitió la separación entre los triglicéridos y el resto de compuestos de bajo peso molecular presentes en los extractos grasos, como son las sustancias relacionadas con el olor sexual. Las ventajas principales que ofreció la aplicación de este procedimiento analítico, en comparación al fraccionamiento en columnas de sílica, fue la obtención de extractos suficientemente purificados en un menor tiempo y la reducción del volumen de disolvente utilizado en la preparación de las muestras.

El material de relleno utilizado en la columna cromatográfica fue el polivinilbenceno, que ofreció un límite de exclusión de 1000 Dalton y requirió el uso de diclorometano como fase móvil. Los aspectos cromatográficos más críticos a tener en cuenta en la cromatografía de filtración de gel son el flujo de la fase móvil para obtener un correcto empaquetamiento del gel dentro de la columna y la cantidad de muestra inyectada para evitar la sobrecarga del sistema analítico. El fraccionamiento de los extractos se realizó en modo isocrático y el flujo de elución se optimizó a  $5\text{cm}^3/\text{min}$ . Por otra parte, las dimensiones de la columna utilizada (680 mm x 25 mm de diámetro interno) permitieron inyectar un total de 500 mg de grasa.

La elución de los compuestos relacionados con el olor sexual se comprobó mediante la utilización de soluciones patrón de escatol y androstenona. La mayor cantidad de androstenona y escatol se recogió en la fracción eluida de la columna de filtración de gel entre los 25 y 45 minutos. Esta fracción se evaporó a sequedad para analizarse mediante GC-MS en modo *SCAN*. Posteriormente, la columna se lavó con 75 ml de diclorometano para asegurar la completa elución de todos los compuestos. El tiempo total de análisis fue de una hora y el sistema puede automatizarse fácilmente mediante la utilización de un colector de fracciones.

El análisis cromatográfico de la fracción recogida reveló la presencia de una elevada cantidad de ácidos grasos libres que dificultaron la interpretación del cromatograma obtenido y obligaron a realizar un procedimiento adicional de saponificación con KOH 3N a temperatura ambiente para evitar la formación de productos de degradación, que interfirieran en la determinación de los compuestos relacionados con el olor sexual. La extracción de la fracción insaponificable en diclorometano permitió la recuperación de los compuestos relacionados con el olor sexual en todas las muestras analizadas sin ninguna dificultad. La determinación



de las sustancias estudiadas fue posible en modo *TIC*, aunque se seleccionaron los fragmentos de masa/carga 117 (indol), 130 (escatol), 145 (7-etilindol), 272 (androsteno), 274 ( $5\alpha$ -androstano-3-ona), 241 (androstenoles) y 258 ( $5\alpha$ -androstano-3 $\alpha$ -ol) para confirmar su identificación. La Figura 3.44 presenta el cromatograma de GC-MS de una solución patrón de los compuestos relacionados con el olor sexual (A) en modo *TIC*, (B) y (C) al seleccionar los fragmentos de *m/z* característicos de cada compuesto obtenidos por impacto electrónico. La Figura 3.45 presenta el cromatograma obtenido en las mismas condiciones correspondiente a una muestra de grasa dorsal de cerdo entero fortificada con 1  $\mu\text{g/g}$  de  $5\alpha$ -androstano-3-ona y purificada mediante cromatografía de filtración de gel. La identificación de los androstenoles se efectuó con el fragmento *m/z* 274 para evitar la presencia de interferencias que dificultaron la interpretación del cromatograma obtenido.

Las concentraciones medias de indol, escatol, androsteno y androstenoles determinadas en muestras de grasa dorsal con concentraciones bajas de escatol y androsteno (grupo BB) se presentan en la Tabla 3.76. Las concentraciones medias de los compuestos relacionados con el olor sexual, a excepción del escatol ( $P < 0,05$ ), no presentaron diferencias significativas entre las muestras de grasa clasificadas con olor sexual por un panel test en comparación a las muestras control.

Los compuestos identificados en el análisis cromatográfico por GC-MS de la fracción recuperada y su porcentaje de identificación se presentan en la Tabla 3.77. Los aldehidos fueron los compuestos identificados mayoritariamente, aunque también se observó una cantidad de ácidos grasos, principalmente de cadena larga (tetradecanoico, hexadecanoico, octadecanoico), en forma de ésteres metílicos o etílicos. El ácido aminocaproico (Tabla 3.78) presentó una concentración media significativamente superior ( $P < 0,05$ ) en las muestras de grasa con defecto sensorial. Las concentraciones descritas son solamente indicativas, ya que la cuantificación de los compuestos identificados en este análisis experimental se efectuó a partir del patrón interno de la androsteno ( $5\alpha$ -androstano-3-ona) o del escatol (7-etilindol), sustancias químicamente diferentes a los compuestos estudiados, aunque el cálculo se realizó en los cromatogramas *TIC*.

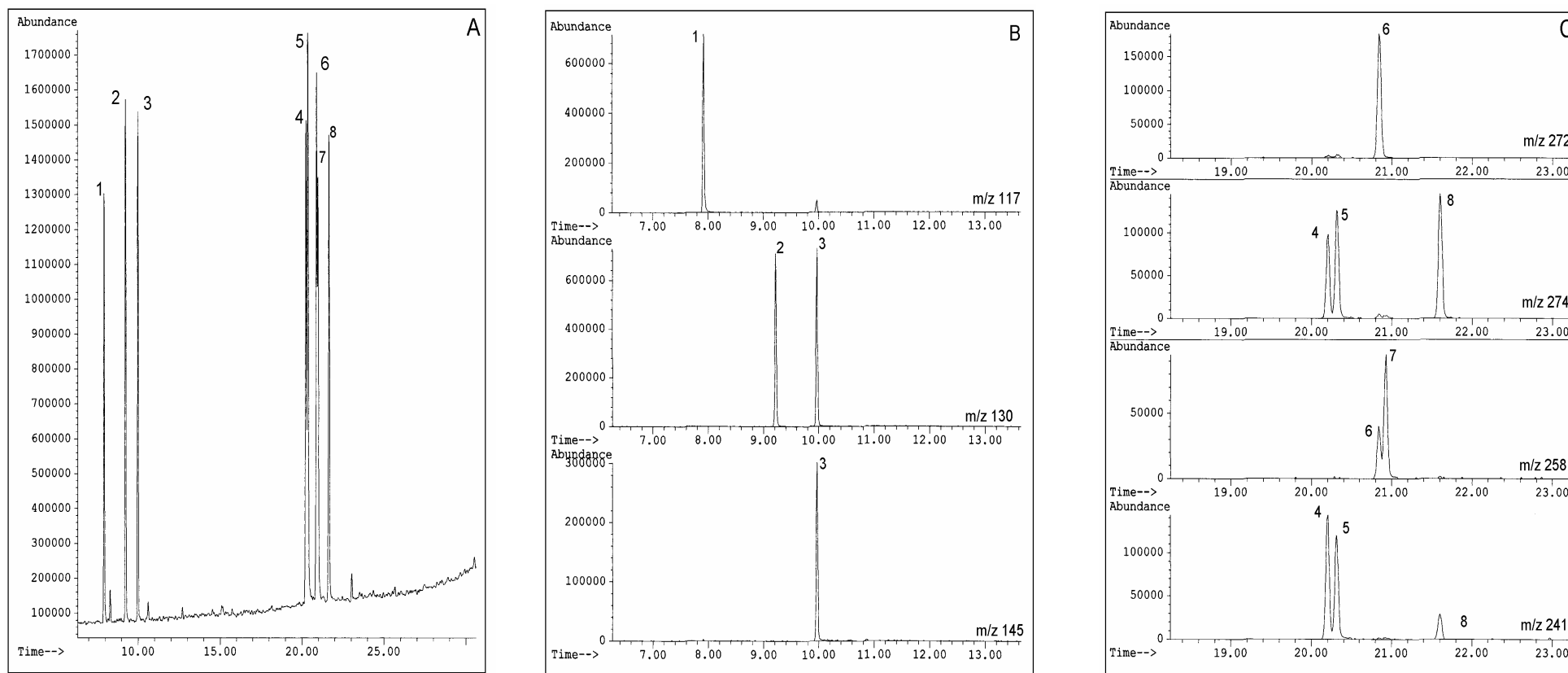


Figura 3.44. Cromatograma de GC-MS de una solución patrón de indol, escatol, androstenona, androstenoles y sus respectivos patrones internos. Sistema de detección: (A) modo *TIC*, (B) selección de los fragmentos  $m/z$  117,  $m/z$  130,  $m/z$  145 y (C) selección de los fragmentos  $m/z$  272,  $m/z$  274,  $m/z$  258,  $m/z$  241. Identificación de los picos: (1) indol, (2) **escatol**, (3) **7-etilindol**, (4)  $5\alpha$ -androst-16-en- $3\alpha$ -ol, (5)  $5\alpha$ -androst-16-en- $3\beta$ -ol, (6)  $5\alpha$ -androst-16-en-3-ona, (7)  $5\alpha$ -androstan- $3\alpha$ -ol y (8)  $5\alpha$ -androstan-3-ona

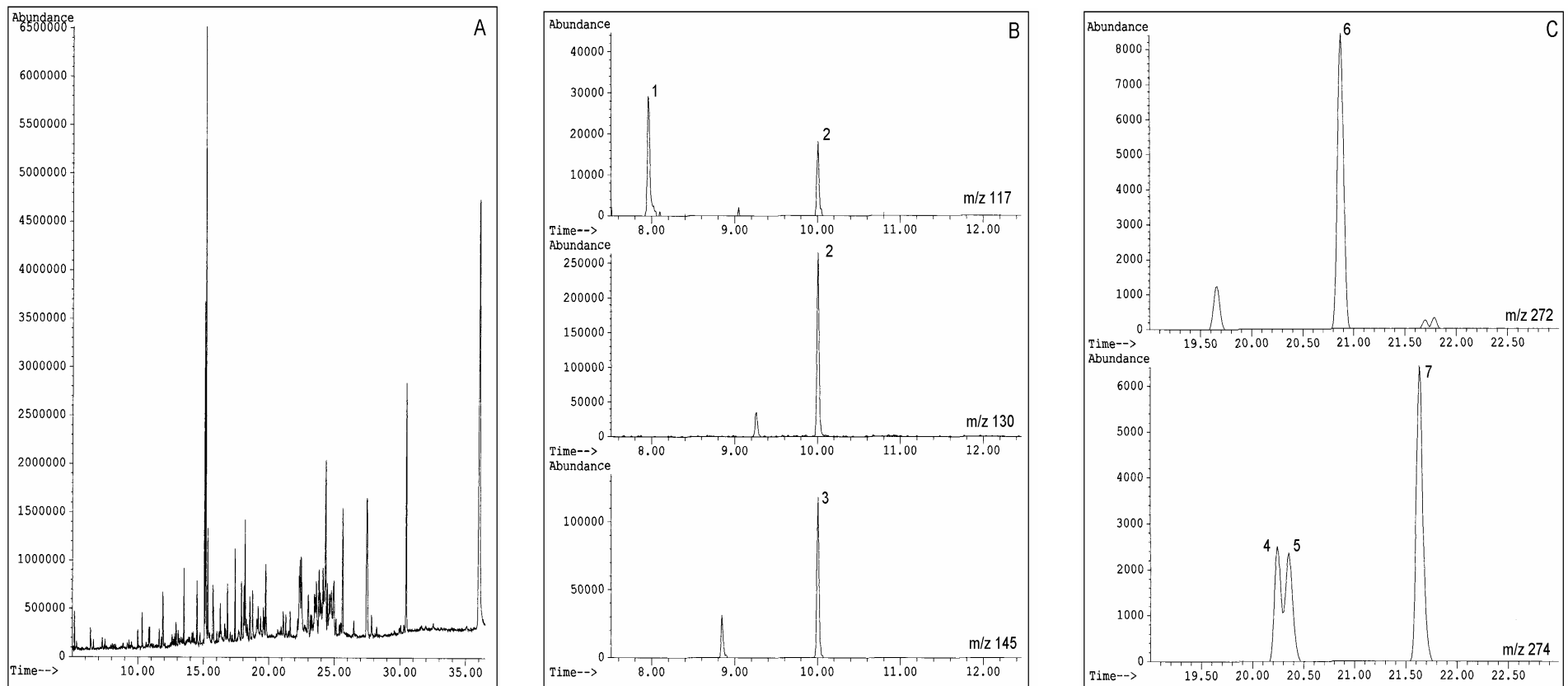


Figura 3.45. Cromatograma de GC-MS de una muestra de grasa dorsal de cerdo entero a la que se adicionó  $1\mu\text{g/g}$  de  $5\alpha$ -androstano-3-ona como patrón interno y se purificó mediante filtración. Sistema de detección: (A) modo *TIC*, (B) selección de los fragmentos obtenidos por impacto electrónico  $m/z$  117,  $m/z$  130,  $m/z$  145 y (C) selección de los fragmentos obtenidos por impacto electrónico  $m/z$  272,  $m/z$  274. Identificación de los picos: (1) indol, (2) escatol, (3) 7-etilindol, (4)  $5\alpha$ -androst-16-en-3 $\alpha$ -ol, (5)  $5\alpha$ -androst-16-en-3 $\beta$ -ol, (6)  $5\alpha$ -androst-16-en-3-ona y (7)  $5\alpha$ -androstano-3-ona

Tabla 3.76. Medias por mínimos cuadrados (X) y error típico (ET) de las concentraciones (ng/g de grasa dorsal) de los compuestos relacionados con el olor sexual en cerdos enteros clasificados con concentraciones bajas de escatol y androstenona (BB). Análisis mediante cromatografía de filtración de gel y GC-MS.

	BT <sup>1</sup>	C <sup>1</sup>	ET	Significación <sup>5</sup>
indol	235,94	183,92	56,18	NS
escatol	347,52 <sup>a</sup>	136,10 <sup>b</sup>	52,41	*
5 $\alpha$ -An <sup>2</sup>	296,66	159,42	73,64	NS
5 $\alpha$ -An-3 $\alpha$ -ol <sup>3</sup>	28,67	44,15	14,79	NS
5 $\alpha$ -An-3 $\beta$ -ol <sup>4</sup>	33,15	37,99	12,52	NS

<sup>1</sup>Clasificación de las muestras de grasa según el análisis sensorial. (BT) muestras de grasa con olor sexual; (C) muestras de grasa control

5 $\alpha$ -An<sup>2</sup>: 5 $\alpha$ -androst-16-en-3-ona; 5 $\alpha$ -An-3 $\alpha$ -ol<sup>3</sup>: 5 $\alpha$ -androst-16-en-3 $\alpha$ -ol; 5 $\alpha$ -An-3 $\beta$ -ol<sup>4</sup>: 5 $\alpha$ -androst-16-en-3 $\beta$ -ol

Nivel de significación<sup>5</sup>: \* (P<0,01); NS (no significativa)

Tabla 3.77. Familias de compuestos identificados en grasa dorsal de cerdo entero con concentraciones bajas de escatol y androstenona (BB). Análisis mediante cromatografía de filtración de gel y GC-MS.

Familia	Compuesto	Probabilidad
	nonanal	86
	2,4-nonadienal	64
	decanal	58
	2-decenal	86
	2,4-decadienal	91
<i>Aldehidos</i>	2-undecenal	58
	2-dodecenal	64
	tridecanal	52
	tetradecanal	50
	hexadecanal	93
	octadecanal	74
	aminocaproico	78
	decanoico	94
	dodecanoico	76
	tetradecanoico	98
<i>Ácidos (ésteres metílicos)</i>	hexadecanoico	99
	9-hexadecenoico	99
	octadecanoico	99
	8,11-octadecadienoico	99
	11-octadecenoico	99
	tetradecanoico	95
<i>Ácidos (ésteres etílicos)</i>	hexadecanoico	95
	octadecanoico	90
	linoleico	97

(sigue)

(continúa)

	docosano	99
	tetradecano	95
	1-tetradecene	98
	pentadecano	97
	1-hexadecene	98
	heptadecano	97
	octadecano	98
<i>Hidrocarburos</i>	3-octadecene	98
	2,6-dimetil octadecano	90
	eicosano	97
	3-eicosene	99
	ciclododecano	95
	ciclotetradecano	96
	ciclohexadecano	98
	1-octadecanol	62
<i>Alcoholes</i>	1-pentadecanetiol	81
	1-nonadecanol	91
	1-eicosanol	95
	butenona <sup>1</sup>	95
	etanona <sup>2</sup>	84
	derivado etanol <sup>3</sup>	80
	derivado fenol <sup>4</sup>	97
	indol	93
<i>Otros</i>	escatol	81
	androstenona	58
	escualeno	87
	colesterol	99
	ftalato	90
	dietil ftalato	97

butenona<sup>1</sup>: 4-fenil-3-buten-2-ona; etanona<sup>2</sup>: etanona,2-(2-metilpropoxi)-1,2-difenil; derivado etanol<sup>3</sup>: etanol, 2-(2-butoxi)etoxi; derivado fenol<sup>4</sup>: fenol 2,4-bis-(1,1-dimetiletíl)

Tabla 3.78. Medias por mínimos cuadrados (X) y error típico (ET) de las concentraciones (ng/g) de los compuestos identificados en grasa dorsal de cerdo entero con concentraciones bajas de escatol y androstenona. Cuantificación relativa respecto al patrón interno de los compuestos indólicos (7-etilindol) y de la androstenona (5 $\alpha$ -androstan-3-ona). Análisis mediante filtración de gel y GC-MS.

	7-etilindol				5 $\alpha$ -androstan-3-ona			
	BT <sup>1</sup>	C <sup>1</sup>	ET	Significación <sup>7</sup>	BT <sup>1</sup>	C <sup>1</sup>	ET	Significación <sup>7</sup>
derivado fenol <sup>2</sup>	1043,66 <sup>a</sup>	226,45 <sup>b</sup>	156,99	**	692,01 <sup>a</sup>	139,83 <sup>b</sup>	115,47	**
derivado etanol <sup>3</sup>	159,76	374,18	78,10	NS	97,30	186,81	46,72	NS
derivado etanona <sup>4</sup>	1352,45 <sup>a</sup>	125,54 <sup>b</sup>	282,65	*	830,31 <sup>a</sup>	175,02 <sup>b</sup>	148,51	**
ac. aminocaproico	328,85 <sup>a</sup>	42,63 <sup>b</sup>	80,96	*	208,30 <sup>a</sup>	52,59 <sup>b</sup>	43,03	*
butenona <sup>5</sup>	194,24 <sup>a</sup>	41,40 <sup>b</sup>	25,56	*	119,50 <sup>a</sup>	49,37 <sup>b</sup>	21,12	**
anisol <sup>6</sup>	354,91	644,44	90,85	NS	214,18	333,59	58,98	NS

<sup>1</sup>Clasificación de las muestras de grasa según el análisis sensorial. (BT) muestras de grasa con olor sexual; (C) muestras de grasa control

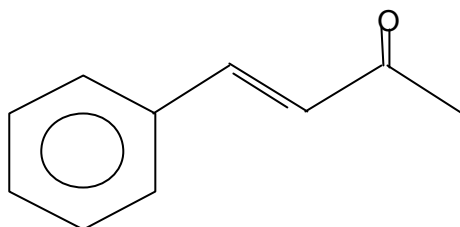
derivado fenol<sup>2</sup>: fenol 2,4-bis-(1,1,-dimetiletil); derivado etanol<sup>3</sup>: etanol 2,2-butoxiatoxi; derivado etanona<sup>4</sup>: etanona 2-(2-metilpropoxi)-1,2-difenil; butenona<sup>5</sup>: 4-fenil-3-buten-2-ona; anisol<sup>6</sup>: hidroxianisol

Nivel de significación<sup>7</sup>: \*\* (P<0,01); \* (P<0,05); NS (no significativa)

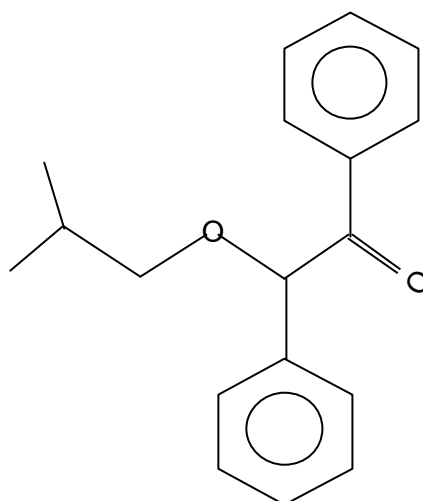
Algunos de los compuestos identificados en el análisis cromatográfico mediante GC-MS no se detectaron en todas las muestras analizadas. Las concentraciones medias de 4-fenil-3-buten-2-ona, etanona 2-(2-metilpropoxi)-1,2-difenil y fenol 2,4-bis-(1,1-dimetiletil) fueron significativamente superiores ( $P < 0,01$  y  $P < 0,05$ , Tabla 3.78) en las muestras de grasa clasificadas con olor sexual según la valoración sensorial de un panel test y concentraciones bajas de escatol y androstenona. Estos compuestos no se detectaron en las muestras de grasa dorsal fortificadas con escatol, androstenona y androstenoles con la finalidad de evaluar la capacidad de la metodología de filtración de gel para la separación entre los compuestos relacionados con el olor sexual y el resto de triglicéridos de la matriz, por ello, estos compuestos no pueden considerarse artefactos producidos durante el desarrollo del método analítico, principalmente en el procedimiento de saponificación aplicado. Las estructuras moleculares de la 4-fenil-3-buten-2-ona y de la etanona 2-(2-metilpropoxi)-1,2-difenil se presentan en la Figura 3.46.

La similitud entre el espectro de masas del pico identificado como 4-fenil-3-buten-2-ona en las muestras de grasa analizadas y el espectro de masas correspondiente a una solución patrón de este compuesto se aprecia en la Figura 3.47. El cromatograma de HPLC-FR y el espectro UV de absorción (200-340 nm) de una solución patrón de 4-fenil-3-buten-2-ona y el cromatograma y espectro UV correspondiente a una muestra de grasa dorsal de cerdo entero clasificada con olor sexual por los miembros del panel test y con concentraciones bajas de escatol y androstenona se presentan en la Figura 3.48 y Figura 3.49, respectivamente. El pico eluido a un tiempo de retención de 3,24 minutos presenta, en ambos casos, un máximo de absorción pronunciado a una longitud de onda de 290 nm.





*4-fenil-3-buten-2-ona*



*Etanona 2-(2-metilpropoxi)-1,2-difenil*

Figura 3.46. Estructuras moleculares de la 4fenil-3-buten-2-ona y de la etanona 2-(2-metilpropoxi)-1,2-difenil, compuestos identificados mediante GC-MS en muestras de grasa dorsal de cerdo clasificadas con olor sexual por los miembros de un panel test y con concentraciones bajas de escatol y androstenona

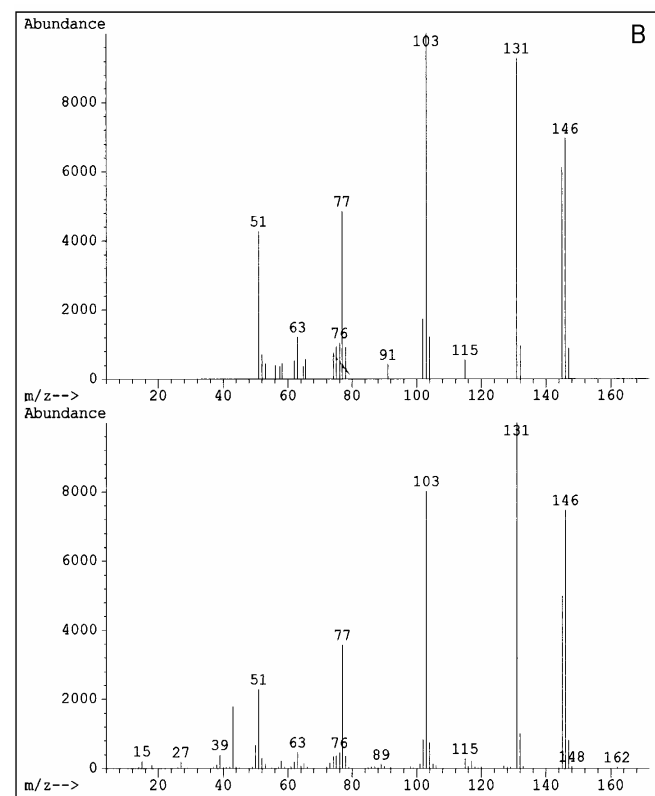
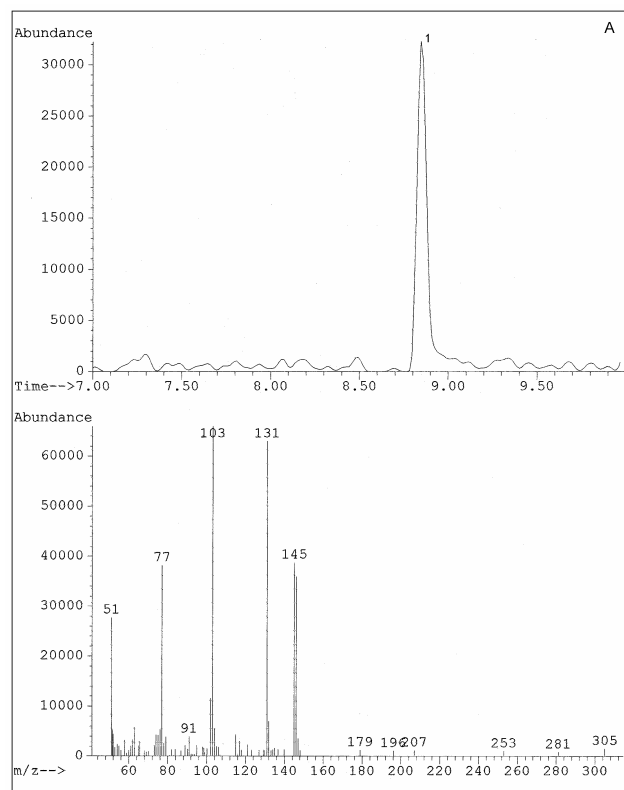


Figura 3.47. (A) Cromatograma de GC-MS en modo *TIC* y espectro de masas del pico identificado como 4-fenil-3-buten-2-ona en las muestras de grasa dorsal de cerdo entero con concentraciones bajas de escatol y androstenona analizadas mediante filtración de gel. (B) Comparación entre el espectro de masas del patrón de 4-fenil-3-buten-2-ona y el espectro de masas obtenido en la librería de espectros. Identificación de los picos: (1), 4-fenil-3-buten-2-ona

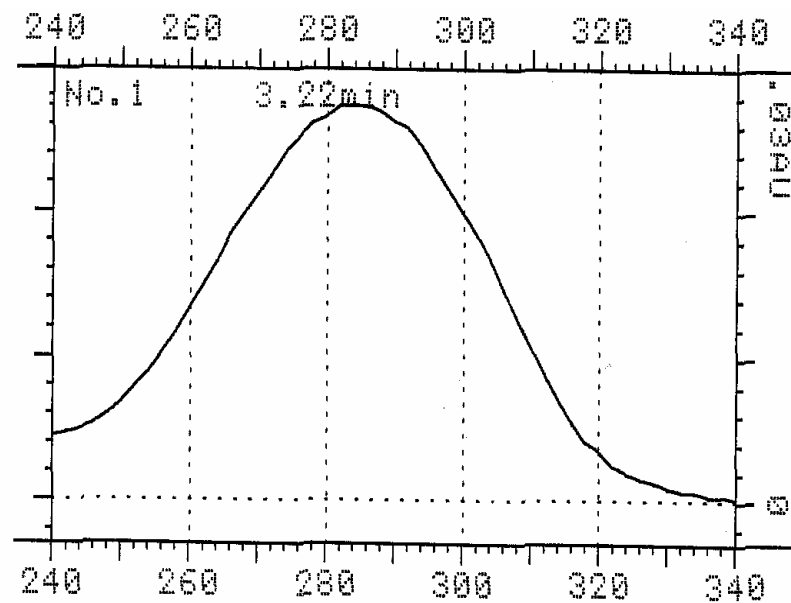
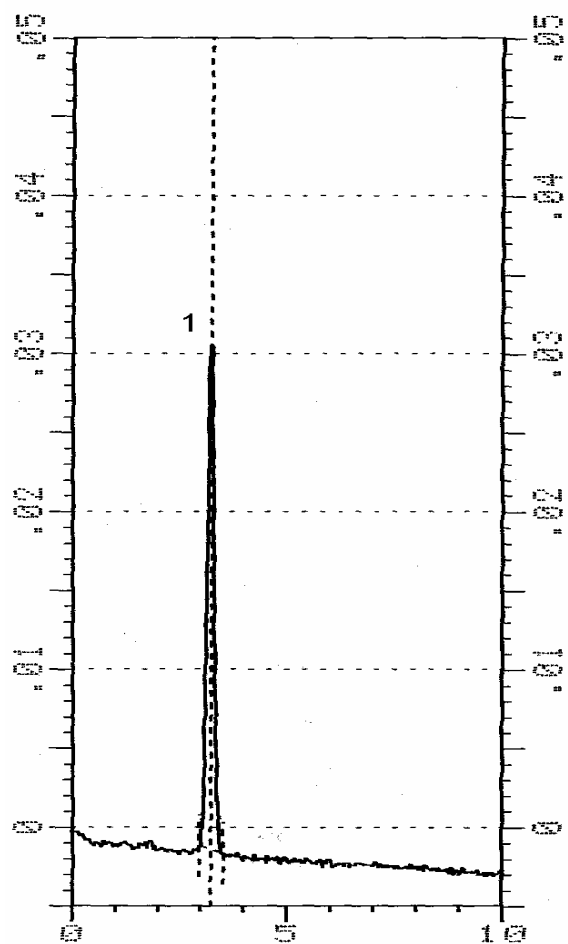


Figura 3.48. Cromatograma de HPLC-FR y espectro de ultravioleta (240-340 nm) de una solución patrón de 4-fenil-3-buten-2-ona (1)

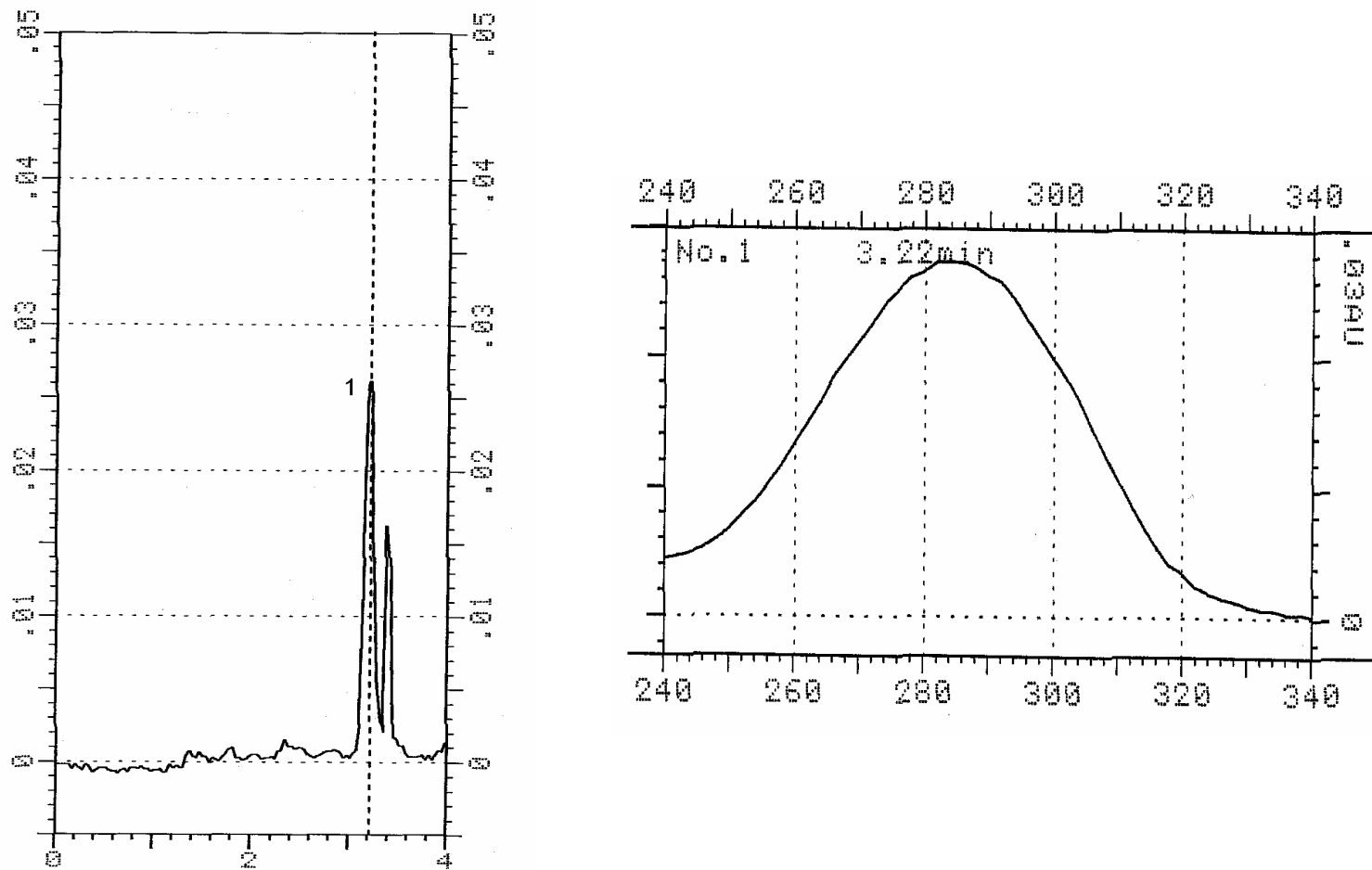


Figura 3.49. Cromatograma de HPLC-FR y espectro ultravioleta (240-340nm) de un extracto de grasa dorsal de cerdo entero con olor sexual y concentraciones bajas de escatol y androstenona purificado mediante filtración de gel. Identificación de los picos: (1) 4-fenil-3-buten-2-ona

La evaluación sensorial de muestras de grasa dorsal a las que se adicionaron diferentes concentraciones de 4-fenil-3-buten-2-ona en combinación con la androstenona y el escatol mostraron que la presencia de este compuesto influye en el umbral de detección de la androstenona y en los atributos sensoriales que definen la presencia de los compuestos relacionados con el olor sexual. Los panelistas seleccionados, sensibles todos a la androstenona, fueron capaces de detectar la presencia de la  $5\alpha$ -An a concentraciones inferiores a  $0,01 \mu\text{g/g}$  en presencia de  $0,5 \mu\text{g/g}$  de la 4-fenil-3-buten-2-ona. Sin embargo, los panelistas identificaron rápidamente el olor a orina y a macho característicos de la  $5\alpha$ -An, independientemente de la concentración de 4-fenil-3-buten-2-ona, cuando la concentración de androstenona era superior a  $0,5 \mu\text{g/g}$ .

Los atributos sensoriales que los miembros del panel seleccionado utilizaron en la caracterización de las muestras de grasa con concentraciones bajas de escatol ( $<0,10 \mu\text{g/g}$ ) y 4-fenil-3-buten-2-ona ( $0,25 \mu\text{g/g}$ ) fueron ropa sucia, naftalina, cerdo y, en general, olor desagradable. El aroma característico del escatol se identificó claramente en todas las muestras de grasa a partir de una concentración de  $0,15 \mu\text{g/g}$ . La presencia de 4-fenil-3-buten-2-ona en las muestras de grasa a distintas concentraciones no dificultó la identificación del escatol, aunque los panelistas también describieron aroma a naftalina y picante. La evaluación sensorial de las muestras de grasa fortificadas únicamente con 4-fenil-3-buten-2-ona mostraron que, el aroma de este compuesto se asociaba a escatol y naftalina a concentraciones elevadas y a un olor dulce a concentraciones bajas.

El espectro de masas del compuesto identificado como un derivado de la etanona en el análisis cromatográfico de las muestras de grasa analizadas se presenta en la Figura 3.50. El espectro de masas de este compuesto difiere del espectro de masas obtenido en una solución patrón de la etanona 2-(2-metilpropoxi)-1,2-difenil en la presencia de los fragmentos de  $m/z$  201 y  $m/z$  202 y en la abundancia relativa de los fragmentos  $m/z$  105 y  $m/z$  79, de forma que la identificación del compuesto como etanona 2-(2-metilpropoxi)-1,2-difenil sería tentativa. La Figura 3.51 presenta el espectro de masas del compuesto identificado como fenol 2,4-bis-(1,1-dimetil) de acuerdo a la similitud de su espectro de masas con el espectro obtenido de la librería espectral.

La Tabla 3.79 y la Tabla 3.80 presentan los resultados de la matriz de correlaciones obtenida entre las concentraciones de los compuestos detectados en grasa dorsal mediante cromatografía de filtración de gel y GC-MS según el patrón interno utilizado para su cuantificación. La concentración de escatol se correlacionó significativamente con las concentraciones de los compuestos identificados como fenol 2,4-bis-(1,1-dimetiletil) ( $P < 0,01$ ) y etanona 2-(2-metilpropoxi)-1,2-difenil ( $P < 0,001$ ), mientras que el contenido en androstenona se correlacionó con la concentración del ácido aminocaproico ( $P < 0,05$ ). Además, la concentración del hidroxianisol se correlacionó con la concentración del etanol 2(2-butoxi)etoxi ( $P < 0,001$ ). Las características conformacionales de las canales presentaron una menor influencia sobre los compuestos evaluados. El peso de sacrificio de los animales se correlacionó negativamente con el contenido de ácido aminocaproico ( $P < 0,05$ ) y el porcentaje de magro de las canales se correlacionó positivamente con la concentración de 4-fenil-3-buten-2-ona ( $P < 0,01$ ) y negativamente con la concentración de hidroxianisol ( $P < 0,05$ ).

El análisis de componentes principales de los compuestos identificados en grasa dorsal de cerdo con concentraciones bajas de escatol y androstenona mediante filtración de gel y GC-MS según el patrón interno utilizado en su cuantificación se presenta la Figura 3.52. Los compuestos de mayor relevancia en el eje del componente 1 fueron la 4-fenil-3-buten-2-ona, el fenol 2,4-bis-(1,1-dimetiletil), la etanona 2-(2-metilpropoxi)-1,2-difenil, el escatol y el ácido 2-indocarboxílico, compuesto identificado mediante GC-MS en el estudio cromatográfico de las fracciones eluidas de la columna de sílica. El etanol 2,2-butoxi)etoxi y el hidroxianisol contribuyeron a la varianza de ambos componentes, mientras que la androstenona, el indol y el ácido aminocaproico participaron en la varianza del tercer componente (17,59%).

La disposición de las muestras de grasa sobre los ejes permitió su diferenciación en el componente 1 (37,44% y 38,49%) según la valoración sensorial de las muestras de grasa analizadas. Las muestras de grasa clasificadas con olor sexual y concentraciones bajas de los compuestos relacionados con el olor sexual se asociaron a la presencia de escatol, androstenona, ácido 2-indocarboxílico, 4-fenil-3-buten-2-ona, fenol 2,4-bis-(1,1-dimetiletil), etanona 2(2-metilpropoxi)-1,2-difenil en la grasa. Sin embargo, la presencia del derivado del etanol y del hidroxianisol se relacionó con las muestras de grasa que, según el panel test, no presentaron defecto sensorial.

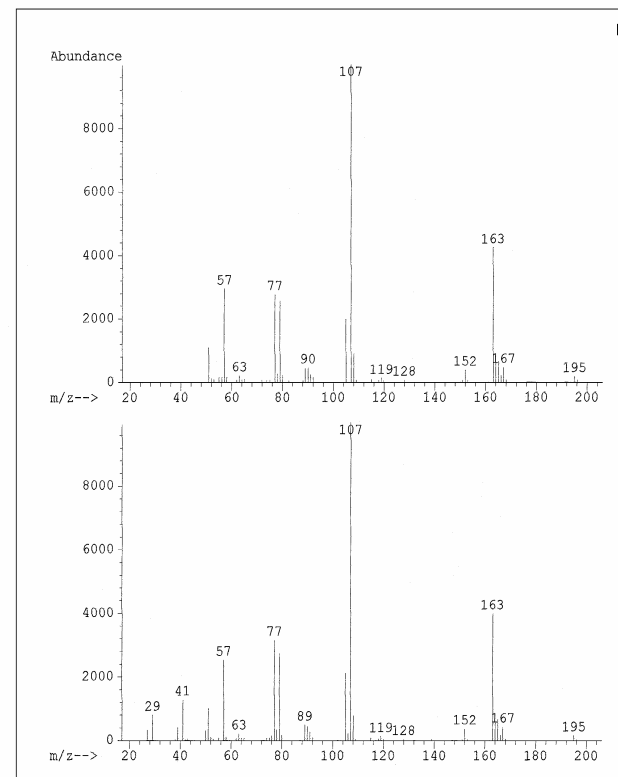
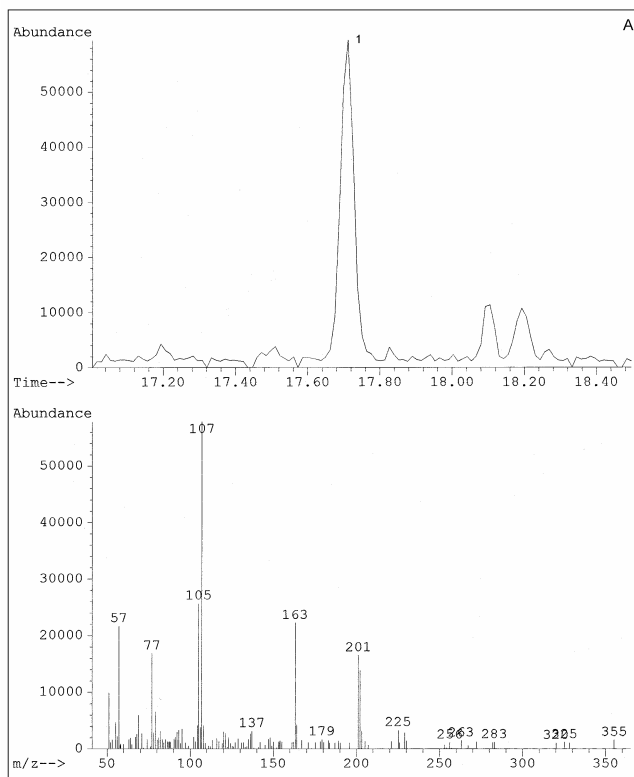


Figura 3.50. (A) Cromatograma de GC-MS en modo *TIC* y espectro de masas del pico identificado de forma tentativa como etanona 2-(2-metilpropoxi)-1,2-difenil en las muestras de grasa dorsal de cerdo entero clasificadas con olor sexual y concentraciones bajas de escatol y androstenona. Análisis mediante filtración de gel y GC-MS. (B) Comparación entre los espectros de masas del patrón de la etanona 2-(2-metilpropoxi)-1,2-difenil y el obtenido en la librería de espectros. Identificación de los picos: (1) etanona 2-(2-metilpropoxi)-1,2-difenil

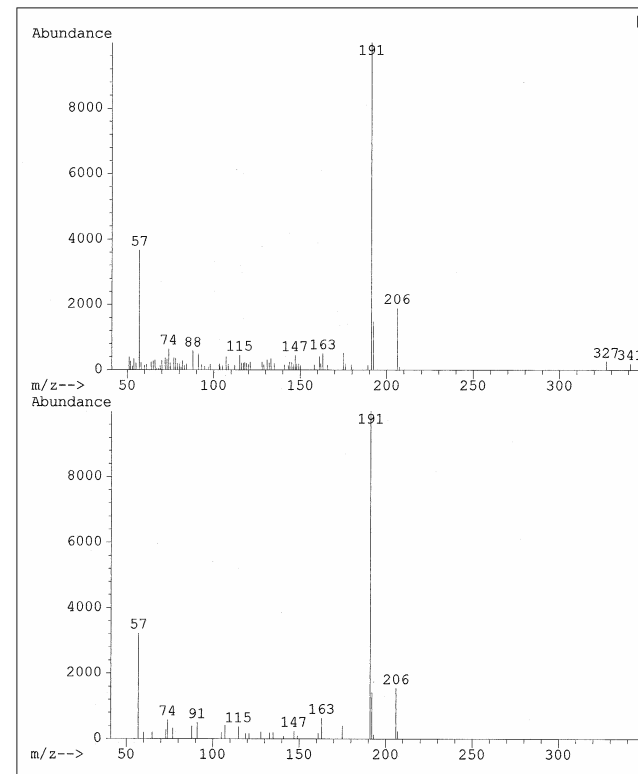
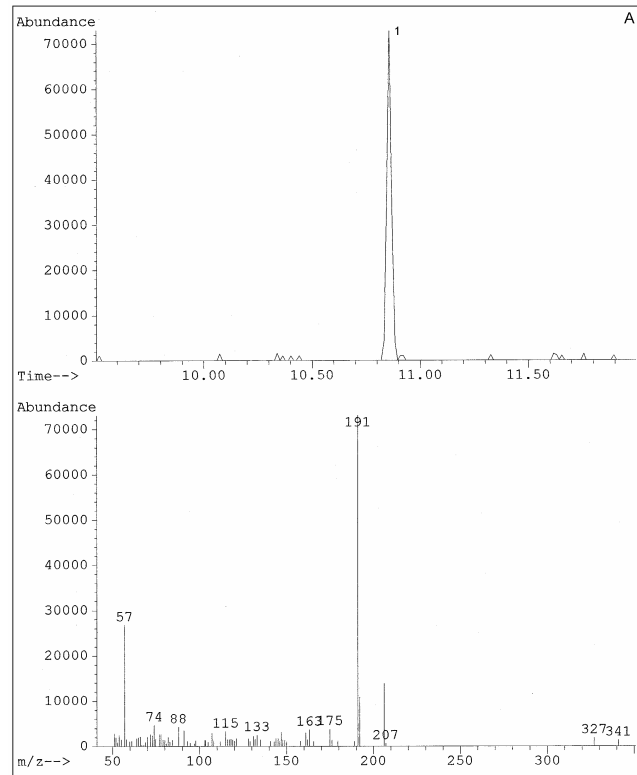


Figura 3.51. (A) Cromatograma de GC-MS en modo TIC y espectro de masas del pico identificado de forma tentativa como fenol 2,4-bis-(1,1-dimetiletil) en las muestras de grasa dorsal de cerdo entero clasificadas con olor sexual y concentraciones bajas de escatol y androstenona. Análisis mediante filtración de gel y GC-MS. (B) Comparación entre los espectros de masas del compuesto identificado como fenol 2,4-bis-(1,1-dimetiletil) y el obtenido en la librería de espectros. Identificación de los picos: (1) fenol 2,4-bis-(1,1-dimetiletil)



Tabla 3.79. Coeficientes de correlación de *Pearson* entre las concentraciones (ng/g) de los compuestos identificados en grasa dorsal de cerdo entero clasificadas con olor sexual y concentraciones bajas de escatol y androstenona. Análisis mediante filtración de gel y GC-MS. Cuantificación relativa respecto la concentración y el área del patrón interno de la androstenona (5 $\alpha$ -androstan-3-ona).

	peso	% magro	indol	escatol	5 $\alpha$ -An	5 $\alpha$ -An-3 $\alpha$ -ol	5 $\alpha$ -An-3 $\beta$ -ol	derivado fenol <sup>1</sup>	derivado etanona <sup>2</sup>	aminocaproico	derivado etanol <sup>3</sup>	butenona <sup>4</sup>	anisol <sup>5</sup>
peso	1,0000												
% magro	-0,2305	1,0000											
indol	0,2159	0,2073	1,0000										
escatol	-0,2702	0,4677	0,5682	1,0000									
5 $\alpha$ -An	-0,5784	0,0865	-0,3184	0,1194	1,0000								
5 $\alpha$ -An-3 $\alpha$ -ol	0,0697	-0,2453	-0,3103	-0,1525	0,1892	1,0000							
5 $\alpha$ -An-3 $\beta$ -ol	0,0778	-0,1428	-0,0839	0,1604	0,1075	0,8942***	1,0000						
derivado fenol <sup>1</sup>	-0,4562	0,5568	0,2723	0,9238***	0,3038	-0,0938	0,1961	1,0000					
derivado etanona <sup>2</sup>	-0,4768	0,5910	0,5552	0,7845**	0,3728	-0,2674	-0,0194	0,7276*	1,0000				
aminocaproico	-0,7283*	0,5344	-0,2338	0,2347	0,7541*	-0,2181	-0,2073	0,4778	0,5714	1,0000			
derivado etanol <sup>3</sup>	-0,2611	-0,5463	-0,2741	-0,2544	-0,0705	-0,5005	-0,5424	-0,2145	-0,3138	-0,0298	1,0000		
butenona <sup>4</sup>	0,0838	0,8416**	0,2772	0,5454	-0,1417	-0,3158	-0,1730	0,5098	0,5015	0,2169	-0,4815	1,0000	
anisol <sup>5</sup>	-0,3380	-0,6340*	-0,2163	-0,2113	-0,0377	-0,3339	-0,3780	-0,2265	-0,2051	-0,0470	0,9244***	-0,5453	1,0000

5 $\alpha$ -An: 5 $\alpha$ -androst 16-en-3-ona; 5 $\alpha$ -An-3 $\alpha$ -ol: 5 $\alpha$ -androst-16-en-3 $\alpha$ -ol; 5 $\alpha$ -An-3 $\beta$ -ol: 5 $\alpha$ -androst-16-en-3 $\beta$ -ol

derivado fenol<sup>1</sup>: fenol 2,4-bis-(1,1,-dimetiletil); derivado etanona<sup>2</sup>: etanona 2-(2-metilpropoxi)- 1,2-difenil; derivado etanol<sup>3</sup>: etanol 2,2-butoxietoxi; butenona<sup>4</sup>: 4-fenil-3-buten-2-ona; anisol<sup>5</sup>: hidroxianisol

Nivel de significación: \*\*\* (P<0,001); \*\* (P<0,01); \* (P<0,05)

Tabla 3.80. Coeficientes de correlación de *Pearson* entre las concentraciones (ng/g) de los compuestos identificados en muestras de grasa dorsal de cerdo entero clasificadas con olor sexual y concentraciones bajas de escatol y androstenona. Análisis mediante filtración de gel y GC-MS. Cuantificación relativa respecto la concentración y el área del patrón interno del escatol (7-etilindol).

	peso	% magro	indol	escatol	5 $\alpha$ -An	5 $\alpha$ -An-3 $\alpha$ -ol	5 $\alpha$ -An-3 $\beta$ -ol	derivado fenol <sup>1</sup>	derivado etanona <sup>2</sup>	aminocaproico	derivado etanol <sup>3</sup>	butenona <sup>4</sup>	anisol <sup>5</sup>
peso	1,0000												
% magro	-0,2305	1,0000											
indol	0,2159	0,2073	1,0000										
escatol	-0,2702	0,4677	0,5682	1,0000									
5 $\alpha$ -An	-0,5784	0,0865	-0,3184	0,1194	1,0000								
5 $\alpha$ -An-3 $\alpha$ -ol	0,0697	-0,2453	-0,3103	-0,1525	0,1892	1,0000							
5 $\alpha$ -An-3 $\beta$ -ol	0,0778	-0,1428	-0,0839	0,1604	0,1075	0,8942***	1,0000						
derivado fenol <sup>1</sup>	-0,2955	0,5428	0,5387	0,9452***	0,3168	-0,2008	0,0757	1,0000					
derivado etanona <sup>2</sup>	-0,4040	0,4785	0,6043	0,7378*	0,4049	-0,2857	-0,0848	0,7861**	1,0000				
aminocaproico	-0,5587	0,4316	-0,1253	0,2235	0,8304**	-0,2149	-0,2409	0,4697	0,5683	1,0000			
derivado etanol <sup>3</sup>	0,1679	-0,4591	0,1137	-0,3819	-0,2888	-0,5403	-0,6128	-0,3234	-0,3529	-0,2204	1,0000		
butenona <sup>4</sup>	0,1622	0,6643*	0,2721	0,4625	-0,1045	-0,3217	-0,2510	0,4207	0,4634	0,1602	-0,4661	1,0000	
anisol <sup>5</sup>	0,1994	-0,5619	0,2721	-0,3698	-0,3021	-0,4488	-0,5371	-0,3310	-0,2346	-0,2519	0,9431***	-0,4809	1,0000

5 $\alpha$ -An: 5 $\alpha$ -androst-16-en-3-ona; 5 $\alpha$ -An-3 $\alpha$ -ol: 5 $\alpha$ -androst-16-en-3 $\alpha$ -ol; 5 $\alpha$ -An-3 $\beta$ -ol: 5 $\alpha$ -androst-16-en-3 $\beta$ -ol

derivado fenol<sup>1</sup>: fenol 2,4-bis-(1,1-dimetiletil); derivado etanona<sup>2</sup>: etanona 2-(2-metilpropoxi)- 1,2-difenil; derivado etanol<sup>3</sup>: etanol 2,2-butoxiatoxi00; butenona<sup>4</sup>: 4-fenil-3-buten-2-ona; anisol<sup>5</sup>: hidroxianisol

Nivel de significación: \*\*\* (P<0,001); \*\* (P<0,01); \* (P<0,05)

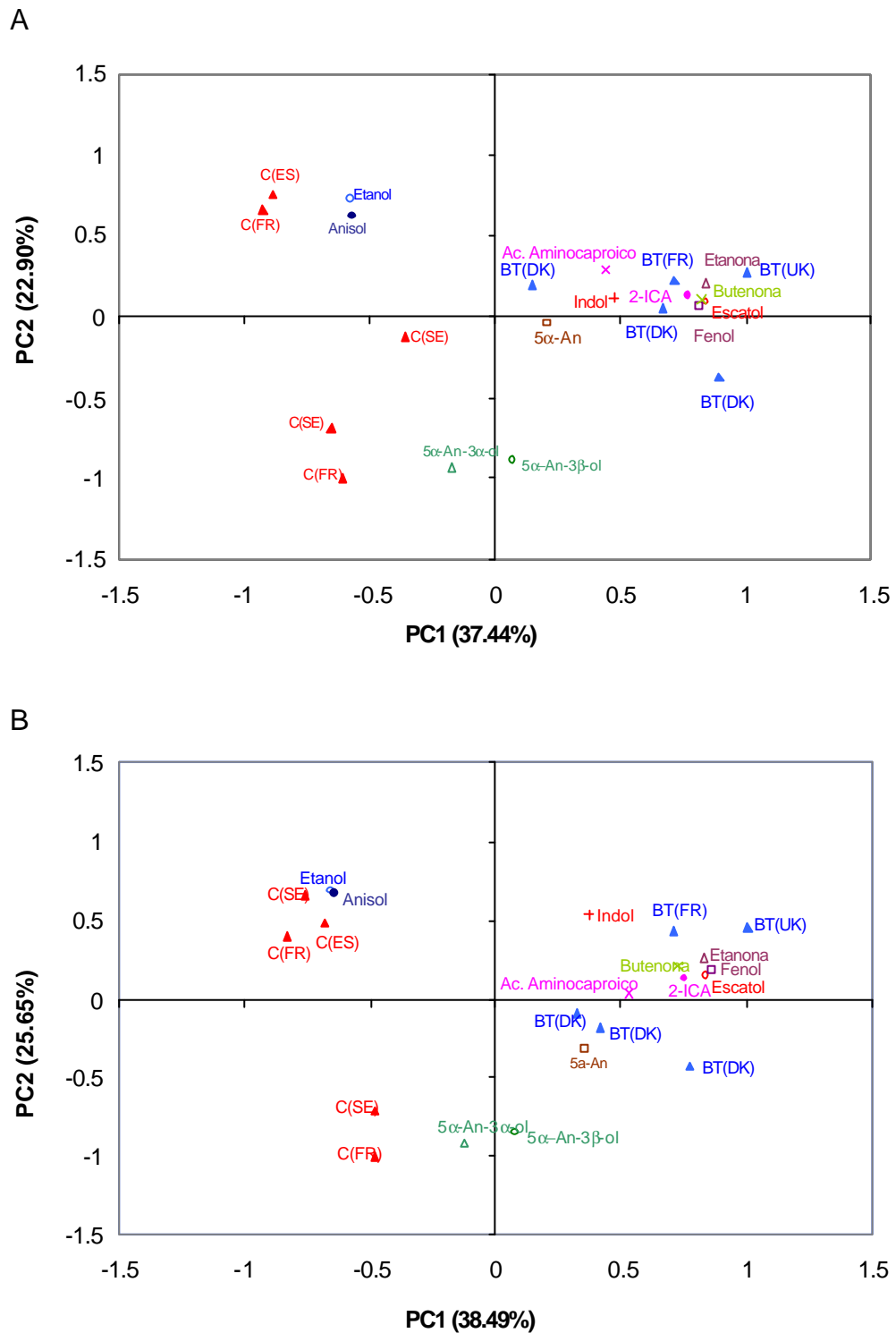


Figura 3.52. Análisis de componentes principales de los compuestos identificados en muestras de grasa dorsal de cerdo entero clasificadas con olor sexual y concentraciones bajas de escatol y androstenona. Análisis mediante filtración de gel y GC-MS. (A) cuantificación relativa al patrón interno de la androstenona y (B) cuantificación relativa al patrón interno del escatol

## **CAPITULO IV**

### *Discusión*

El olor sexual es un defecto sensorial asociado a las canales de cerdos enteros de gran importancia económica, porque influye en la producción e intercambio comercial entre los diferentes países europeos con actitudes muy diversas frente a esta problemática. Los diversos estudios realizados hasta el momento han mostrado que el escatol y la androstenona, sustancias químicas de naturaleza y origen muy diferente, son los principales compuestos responsables del olor sexual (Hanson y col., 1980; Bonneau, 1982). No obstante, la contribución específica de cada compuesto al desarrollo de este defecto sensorial no se ha establecido con exactitud y la ausencia de un criterio unánime es consecuencia de los diferentes sistemas de producción y hábitos culinarios observados entre países y de la distinta percepción sensorial de los consumidores frente a la androstenona (Weiler y col., 1997).

El desarrollo de cualquier estudio sobre el olor sexual presenta la dificultad de enfrentarse a un problema de carácter multifactorial que engloba aspectos genéticos, fisiológicos y ambientales, pero su control es esencial para evitar una excesiva variabilidad, debido a la notable influencia que ejercen sobre las concentraciones de escatol y androstenona en grasa.

La ausencia de correlación observada en este estudio entre las concentraciones de escatol y androstenona en grasa implica que una evaluación correcta de la incidencia del olor sexual en las canales de cerdos enteros requiere la determinación simultánea de ambos compuestos y, por tanto, el desarrollo de métodos analíticos adecuados. Posteriormente, la aplicación de estos métodos analíticos en la línea de sacrificio estará determinada por diversos factores, como su coste económico, la relación entre la capacidad de procesamiento de las muestras y el tiempo de análisis disponible, la compatibilidad con el entorno de trabajo de un matadero y, principalmente, su especificidad en la determinación de los compuestos implicados en el olor sexual.

El desarrollo de los métodos de purificación utilizados en este estudio (extracción en fase sólida con columnas de sílica y cromatografía de filtración de gel) permitió evaluar la contribución al desarrollo del olor sexual de determinados compuestos identificados en el tejido adiposo de muestras clasificadas con defecto sensorial por un panel test y concentraciones bajas de escatol y androstenona. Los trabajos

descritos en la bibliografía en este sentido son escasos y el desarrollo de esta parte del trabajo de Tesis fue la que entrañó mayor dificultad, pero ofreció la posibilidad de obtener nuevos datos e identificar otros posibles compuestos que afectan la aparición del olor sexual. Los principales problemas analíticos estuvieron ocasionados por la interferencia de la matriz lipídica, que dificultó el análisis y la interpretación de los cromatogramas obtenidos. Por otra parte, la grasa es un tejido en el que se deposita una elevada cantidad de compuestos sintetizados por el propio metabolismo del animal, como los compuestos implicados en el olor sexual, pero otras sustancias pueden tener un origen exógeno y proceder de las materias primas utilizadas en la elaboración de piensos o de los sistemas de envasado utilizados en la conservación y comercialización de los productos alimentarios. La amplia diversidad de compuestos químicos presentes en el tejido adiposo pueden contribuir al aroma final de un producto cárnico y desarrollar olores desagradables denominados de modo genérico en inglés *boar odours*.

#### **4.1. Metodologías analíticas desarrolladas en este estudio para la determinación de los compuestos relacionados con el olor sexual en muestras de grasa dorsal de cerdo**

Las sustancias responsables del olor sexual, debido a sus características físico-químicas, se depositan básicamente en el tejido adiposo. La eliminación de la matriz lipídica es la principal dificultad que presenta el desarrollo de metodologías analíticas para la determinación de la concentración de escatol y androstenona y supone la realización de procesos de purificación que incrementan el tiempo de análisis y limitan el número de muestras a analizar.

Los métodos desarrollados en este estudio no permiten la determinación de la concentración de escatol y androstenona en la línea de sacrificio, pero pueden utilizarse como métodos de referencia en el laboratorio para evaluar los resultados obtenidos mediante la aplicación de métodos rápidos o bien para evaluar la influencia de diversos factores (alimentación, genética, peso de sacrificio) sobre las concentraciones de los compuestos implicados en el olor sexual.

##### **4.1.1. Determinación de indol y escatol en muestras de grasa dorsal de cerdo mediante HPLC-FN y detección por fluorescencia**

El método de cromatografía líquida en fase normal desarrollado durante el presente trabajo de Tesis para la determinación de la concentración de indol y escatol en muestras de grasa dorsal, a diferencia de las metodologías analíticas descritas en la bibliografía (Peleran y Bories, 1985; García-Regueiro y col., 1986a, b; García-Regueiro y Díaz, 1989; Porter y col., 1989; Hansen-Møller, 1992; Tuomola y col., 1996b, c), no precisa la purificación previa de los extractos grasos obtenidos. La simplicidad del tratamiento de las muestras implica la reducción del tiempo de análisis y consumo de disolventes orgánicos, que se limita básicamente al requerido en la preparación de los extractos y el análisis cromatográfico (aproximadamente 175 ml/10 muestras).

Los métodos descritos en la bibliografía para la determinación de indol y escatol mediante cromatografía líquida utilizan mayoritariamente columnas de fase reversa. No obstante, la cromatografía líquida en fase normal facilita el tratamiento de los extractos que contienen grasa, porque permite la separación

cromatográfica de los compuestos de naturaleza más hidrofóbica (triglicéridos) que son eluidos a tiempos de retención inferiores a los del indol y escatol. La extracción del indol y escatol mediante hexano:2-propanol (92:8) permitió el análisis directo por cromatografía líquida en fase normal de los extractos grasos sin necesidad de incluir pasos intermedios de evaporación, que producen pérdidas de indol y escatol debido a su volatilidad (Porter y col., 1989). Además, este procedimiento cromatográfico evita la saturación de la columna cromatográfica.

La proporción de 2-propanol de la fase móvil influyó claramente en la separación cromatográfica de los compuestos indólicos estudiados. García-Regueiro y Díaz (1989) obtuvieron una buena separación entre el indol y escatol con una mezcla de hexano:2-propanol (96:4) como fase móvil. No obstante, la aplicación de estas condiciones cromatográficas en este estudio produjo la elución simultánea del escatol y el patrón interno utilizado (el 7etilindol). La utilización de una columna cromatográfica de fase normal con un tamaño de partícula de 10  $\mu\text{m}$  permitió la determinación del indol y escatol en muestras de grasa dorsal de cerdo en un tiempo de ocho minutos (García-Regueiro y Díaz, 1989). La optimización de la composición de la fase móvil utilizada en el presente estudio, hexano:2-propanol (92:8), junto a la utilización de una columna cromatográfica con un menor tamaño de partícula (5  $\mu\text{m}$ ), permitió la reducción del tiempo de análisis a cinco minutos. La utilización de columnas cromatográficas de menor longitud y tamaño de partícula (100 x 4,6 mm, 3  $\mu\text{m}$ ), redujo el tiempo de análisis a tres minutos, aunque estas columnas presentaron una menor resolución y una menor capacidad de analizar un número elevado de muestras de grasa.

Las condiciones cromatográficas aplicadas en este estudio no permitieron el análisis simultáneo de otros compuestos indólicos, como el 3-indolacetonitrilo y los ácidos 3-indolacético y 2-indolcarboxílico. La reducción de la proporción de 2-propanol en la fase móvil permitió la determinación de las sustancias de características más polares, pero favoreció el incremento del tiempo de análisis y la disminución de la simetría de los picos correspondientes al indol y escatol. Hansen-Møller (1992) desarrolló un método analítico mediante cromatografía líquida en fase reversa que permite el análisis simultáneo de 12 compuestos relacionados con el indol y escatol. No obstante, a diferencia del método desarrollado en el presente estudio, requiere la purificación de los extractos para la eliminación de la grasa y la aplicación de un gradiente binario para una



separación cromatográfica correcta de los compuestos evaluados, que supone un aumento del tiempo de análisis cromatográfico (20 minutos) y limita el número de muestras a analizar (30 muestras/día).

La detección de los compuestos indólicos mediante detección de fluorescencia ofreció una mayor sensibilidad y selectividad que la detección en ultravioleta (García-Regueiro y col., 1986a, b; García-Regueiro y Díaz, 1989; Dehnhard y col., 1991, 1993; Lin y col., 1991). El límite de detección del método desarrollado (5 ng/g) es similar al obtenido por otros autores en muestras de grasa (Hansen-Møller, 1992; Dehnhard y col., 1993), aunque Tuomola y col. (1996b, c) describieron un valor ligeramente inferior (1 ng/g).

Los porcentajes medios de recuperación obtenidos para el indol (99,57%) y escatol (100,27%) son comparables a los obtenidos mediante la aplicación de diversos métodos de cromatografía líquida descritos en la bibliografía (Tabla 1.2). El porcentaje de recuperación obtenido por Mørtensen y Sørensen (1984) mediante la aplicación del método espectrofotométrico se situó entre 95-105%, aunque este método no es específico del escatol y el indol y otros compuestos de características químicas similares pueden interferir en los resultados y sobrestimar el contenido real de escatol, principalmente cuando se presenta a concentraciones bajas (García-Regueiro y col., 1986a; Tuomola y col., 1996b). García-Regueiro y col. (1986a) describieron una recuperación del 95,4% para el escatol y del 86,9% para el indol mediante la purificación en columnas de florisil de los extractos y la determinación de los compuestos indólicos por cromatografía líquida en fase reversa y detección ultravioleta. Hansen-Møller (1992, 1994) y Tuomola y col. (1996b) indicaron unos porcentajes de recuperación para el escatol e indol próximos al 100%, aunque en ambos casos el material lipídico de los extractos se eliminó mediante columnas de extracción en fase reversa (C<sub>18</sub>).

El análisis de indol y escatol por cromatografía de gases requiere, en general, un incremento de la cantidad de muestra inicial, que dificulta el tratamiento y purificación de los extractos grasos y favorece una disminución de los porcentajes de recuperación. Hanson y col. (1980) describieron un porcentaje de recuperación para el escatol de aproximadamente el 47% y Peleran y Bories (1985) obtuvieron unos valores medios del 62% para el indol y del 83% para el escatol mediante un sistema de detección específico para compuestos con átomos de nitrógeno en su estructura química.

La linealidad del método desarrollado en el margen típico de concentraciones de indol y escatol en muestras de grasa dorsal (0,05-1,0 µg/g) y los valores de los coeficientes de variación obtenidos (<6%) mostraron la viabilidad del método analítico desarrollado para determinar y cuantificar los compuestos indólicos de interés.

Por último, la simplicidad y rapidez del método presentado permiten su aplicación a nivel de laboratorio para la evaluación del efecto de diversos factores, como la alimentación, la genética y la conformación de las canales sobre las concentraciones de escatol e indol en el tejido adiposo porcino. Por otra parte, el tratamiento mínimo de las muestras de grasa permite una capacidad de análisis de aproximadamente 50 muestras por día, que podría incrementarse hasta 100 muestras con la optimización de las columnas cromatográficas de un tamaño de partícula menor (por ejemplo 3 µm).

#### **4.1.2. Determinación de la androstenona y de los androstenoles en muestras de grasa dorsal de cerdo mediante GC-MS**

Los aspectos analíticos más significativos del método desarrollado en este trabajo de Tesis son el análisis simultáneo de la androstenona y de los androstenoles en muestras de grasa dorsal y la separación cromatográfica entre ambos androstenoles. La contribución de la androstenona al olor sexual se ha evaluado en numerosos estudios y en la bibliografía se describen diversos métodos que permiten su determinación en grasa (García-Regueiro y Díaz, 1985, 1989; DeBrabander y Verbeke, 1986; Hansen-Møller, 1994; Mågård y col., 1995). Patterson (1968b) describió la participación de los androstenoles en el olor sexual, principalmente del 5 $\alpha$ -androst-16-en-3 $\alpha$ -ol. No obstante, la contribución de estos compuestos al defecto sensorial no se ha evaluado con exactitud debido al número escaso de métodos descritos que permiten su determinación en muestras de grasa.

La eliminación del material lipídico presente en los extractos grasos es uno de los aspectos más problemáticos en el desarrollo de un método analítico. García-Regueiro y Díaz (1985) indicaron un mayor rendimiento de extracción de la androstenona mediante la utilización de disolventes orgánicos (98%) respecto a la saponificación de los extractos con NaOH 3N (92%). García-Regueiro y Díaz

(1989) eliminaron una parte importante de la grasa mediante precipitación en metanol a temperaturas de congelación y aplicaron un procedimiento de purificación mediante columnas de florisil para eliminar el resto del material lipídico. Posteriormente, Mågård y col. (1995) describieron la extracción de la androstenona y de los androstenoles mediante un sistema de fluidos en el estado supercrítico.

La principal innovación que presenta el método desarrollado durante el presente trabajo de Tesis, en comparación al método analítico desarrollado por García-Regueiro y Díaz (1989), es la precipitación de la grasa en metanol a temperatura ambiente y la simplificación del procedimiento de purificación efectuado mediante la utilización de minicolumnas de octadecilsilica (C18). El resultado es una disminución significativa del tiempo de análisis y consumo de disolventes orgánicos. La purificación de los extractos grasos con columnas de fase reversa (C<sub>18</sub>) facilita la retención del material lipídico en la columna mientras se eluyen la androstenona y los androstenoles (Hansen-Møller, 1992; Tuomola y col., 1996b).

La determinación cromatográfica de la androstenona y de los androstenoles se realizó por GC-MS, según se describe en el apartado 2.3.2. Brennan y col. (1986) y Mågård y col. (1995) determinaron la concentración de androstenona y la concentración suma de los dos androstenoles (5 $\alpha$ -An-3 $\alpha$ -ol+5 $\alpha$ -An-3 $\beta$ -ol) en muestras de grasa dorsal, debido a que no consiguieron su separación cromatográfica mediante la utilización de columnas capilares con una fase estacionaria de características apolares (SE-30 y DB-1, respectivamente). El desarrollo de columnas cromatográficas de polaridad baja, pero ligeramente selectivas, facilitó la separación cromatográfica de los androstenoles. García-Regueiro y Díaz (1989) describieron la determinación cromatográfica de la androstenona y de los dos androstenoles mediante la utilización de una FSOT RSL-300 (50% fenilmetilsilicona) aunque, como se ha señalado anteriormente, el procedimiento de purificación aplicado por estos autores es más laborioso.

El análisis de los androstenoles no requirió la realización de reacciones de derivatización previas, que simplificó y favoreció la determinación de estos compuestos. La derivatización del extracto supone, en muchas ocasiones, un incremento de la complejidad del perfil cromatográfico, debido a la formación de diversos isómeros de algunos productos de reacción.

La detección de la androstenona y de los androstenoles en modo SIM permitió obtener una mayor selectividad y sensibilidad en función de los valores de  $m/z$  seleccionados para los distintos compuestos. De acuerdo con García-Regueiro y Díaz (1989) el fragmento de  $m/z$  272 se seleccionó para la determinación de la androstenona, porque presenta una mayor abundancia y coincide con su peso molecular y el fragmento de  $m/z$  274 se seleccionó para la determinación de los androstenoles, porque permitió la obtención de cromatogramas de mayor selectividad, aunque no es el fragmento de mayor abundancia.

La sensibilidad del método desarrollado para la cuantificación de la androstenona en muestras de grasa (0,05  $\mu\text{g/g}$ ) es comparable a la descrita en la bibliografía (DeBrabander y Verbeke, 1986; Schilt y col., 1989; Mågård y col., 1995) y permite una reducción de la cantidad de muestra inicial y, por tanto, los procedimientos de purificación aplicados.

La androstenona y los androstenoles pueden determinarse también mediante la utilización de detectores de llama si los extractos finales no presentan excesivas impurezas (García-Regueiro y Díaz, 1985, 1989). No obstante, este tipo de detector carece de sensibilidad y selectividad. Tuomola y col. (1998) situaron el límite de detección de la androstenona en 54  $\mu\text{g/g}$  mediante la utilización de un detector FID y una relación señal/ruido de 3:1. Estos autores también describieron un límite de cuantificación para la androstenona de 0,25  $\mu\text{g/g}$  mediante GC-MS, resultado similar al obtenido por Claus y col. (1988) mediante el método ELISA. Hansen-Møller (1994) indicó un límite de cuantificación de la androstenona de 200  $\text{ng/g}$  en muestras de grasa mediante cromatografía líquida y con la utilización de detectores de fluorescencia, previa derivatización de la androstenona con dansilhidracina disuelta en metanol.

La selectividad y sensibilidad que ofrecen los detectores de captura de electrones en la determinación de androstenona mediante GC permite disminuir la cantidad de muestra inicial y, consecuentemente, los procesos de purificación de los extractos grasos obtenidos. En esta ocasión, la androstenona se derivatiza con pentafluorobenzilhidroxilamina (PFBHA) para la obtención de los derivados oxima, que pueden ser detectados mediante detector ECD. García-Regueiro y Díaz (1985) mostraron que la detección de los derivados de la androstenona es lineal en el intervalo de 10  $\text{pg}$ -10  $\text{ng}$  y DeBrabander y Verbeke (1986) cuantificaron la 5 $\alpha$ -An en el intervalo de concentraciones de 0,08-2,6  $\mu\text{g/g}$ .

Los porcentajes medios de recuperación obtenidos en este estudio para la androstenona (97,98%), el 5 $\alpha$ -An-3 $\alpha$ -ol (96,66%) y el 5 $\alpha$ -An-3 $\beta$ -ol (94,84%) fueron ligeramente superiores a los descritos por García-Regueiro y Díaz (1989), que describieron unos valores aproximados del 80% para los tres compuestos. Las diferencias entre los porcentajes de recuperación de ambas metodologías analíticas pueden ser consecuencia de la coprecipitación de los compuestos a temperaturas de congelación o del procedimiento de purificación más laborioso aplicado por estos autores.

García-Regueiro y col. (1986b) obtuvieron un porcentaje de recuperación del 85% al derivatizar la androstenona con 2,4-dinitrofenilhidracina para su posterior análisis mediante HPLC en fase reversa y detección por fluorescencia. Hansen-Møller (1994) mostró una recuperación del 100 $\pm$ 5% para la 5 $\alpha$ -An en el método de análisis cromatográfico desarrollado por HPLC-FR y detección por fluorescencia, que permite la determinación simultánea de indol, escatol y androstenona. Mågård y col. (1995) obtuvieron unos porcentajes de recuperación para la androstenona situados entre 47-89%, según los valores de densidad, temperatura y presión aplicados en la extracción de fluidos en el estado supercrítico.

Por último, Claus y col. (1997a) obtuvieron un porcentaje de recuperación para la androstenona de aproximadamente el 84% mediante la aplicación del método ELISA. Sin embargo, el principal problema que ofrece esta metodología es la existencia de reacciones cruzadas con otros esteroides presentes en la grasa (por ejemplo los androstenoles) y, por tanto, la concentración real de androstenona puede resultar sobrestimada.

#### **4.2. Discrepancia entre la clasificación de las muestras de grasa dorsal de cerdo mediante métodos rápidos inespecíficos y métodos cromatográficos desarrollados en el presente estudio**

El estudio del olor sexual requiere el establecimiento de los umbrales de concentración de escatol y androstenona que determinan la aceptabilidad o el rechazo sensorial de las canales e implica necesariamente la utilización de métodos analíticos capaces de relacionar las concentraciones de los compuestos implicados con los resultados de los análisis sensoriales.

Las concentraciones medias de escatol y androstenona obtenidas en este estudio en muestras de grasa valoradas sensorialmente con olor sexual fueron significativamente superiores a las concentraciones medias observadas en el grupo de muestras control cuando se consideran los resultados obtenidos mediante los métodos cromatográficos desarrollados en este trabajo (HPLC-FN y GC-MS), pero no difirieron significativamente entre si cuando la clasificación de las muestras seleccionadas para este estudio se realizó según los resultados correspondientes al método espectrofotométrico y ELISA.

De acuerdo con estos resultados, Stamer y col. (1993) describieron concentraciones medias de escatol y androstenona similares independientemente de la valoración sensorial de las muestras de grasa, pero determinadas mediante métodos analíticos que presentan una menor especificidad y selectividad (método colorimétrico para el escatol y radioinmunoensayo para la androstenona). La discrepancia entre los resultados descritos puede estar originada por las diferentes metodologías utilizadas en la determinación de los compuestos relacionados con el olor sexual (Xue y col., 1996). Por tanto, la clasificación de canales de cerdos enteros depende, entre otros factores, de la especificidad y fiabilidad de los métodos químicos utilizados para la determinación de la concentración de escatol y androstenona en el tejido adiposo porcino.

La determinación de los compuestos relacionados con el olor sexual mediante los métodos analíticos desarrollados en el presente trabajo de Tesis en muestras de grasa previamente clasificadas según los resultados del método colorimétrico (Hansen-Møller y Andersen, 1994) y ELISA (Claus y col., 1997a) permitió la evaluación de las concentraciones de los compuestos estudiados mediante la

aplicación de metodologías diferentes y su incidencia en la clasificación de las muestras de grasa. La determinación específica del indol y de los androstenoles supuso una aportación significativa a los resultados finales, porqué determinó su contribución en la clasificación de las muestras en los distintos grupos de concentración de escatol y androstenona establecidos previamente.

Estudios recientes realizados en diferentes países europeos han evaluado diversos aspectos relacionados con el olor sexual (Lundström y col., 1988, 1994; Bonneau y col., 1992a; Dehnhard y col., 1993; Hansen-Møller, 1994; Tuomola y col., 1996b) y han observado que la concentración de escatol en la mayoría de los animales sacrificados es inferior a 0,10 µg/g. De acuerdo con estos resultados, el porcentaje de muestras de grasa analizadas en este trabajo que presentaron una concentración de escatol inferior a 0,10 µg/g fue del 64,30%, aunque un porcentaje importante de las canales seleccionadas (28,56%) superó el umbral de aceptabilidad establecido en 0,22 µg/g. La discrepancia entre los porcentajes descritos está originada por una selección distinta de las muestras de grasa, que en este estudio se realizó de forma que todas las categorías de concentraciones de escatol, incluso la de concentraciones elevadas, estuvieran cualitativa y cuantitativamente representadas.

Las concentraciones máximas de escatol (0,65 µg/g) e indol (0,57 µg/g) determinadas en este trabajo fueron similares, aunque un mayor número de canales (88,10%) presentaron una mayor concentración de escatol, porcentajes similares a los descritos por Lundström y col. (1988), García-Regueiro y Díaz (1989) y Bonneau y col. (1993a). En un estudio previo, García-Regueiro y Rius (1998) observaron una mayor concentración de escatol en el 68,75% de las muestras de grasa seleccionadas al azar en un matadero local. No obstante, Hanson y col. (1980) mostraron que los cerdos castrados y las hembras presentan una mayor concentración de indol.

Las concentraciones de escatol e indol en el tejido adiposo determinadas por HPLC-FN en el presente trabajo se correlacionaron significativamente ( $P < 0,001$ ) entre sí. Resultados similares se han descrito en diferentes estudios (Bejerholm y Barton-Gade, 1993; Dehnhard y col., 1993; Hansen y col., 1994; Tuomola y col., 1996b y Andersson y col., 1997). La competencia por el triptófano, sustrato común en el metabolismo de las bacterias intestinales productoras de indol y escatol,

explica la correlación entre las concentraciones de estos compuestos en el tejido adiposo.

Sin embargo, las concentraciones máximas de escatol e indol determinadas en este trabajo difirieron notablemente de las descritas en otros estudios, aunque los resultados son variables. García-Regueiro y Díaz (1989) obtuvieron unas concentraciones máximas de escatol e indol inferiores (0,19 µg/g y 0,17 µg/g, respectivamente) al analizar muestras de grasa seleccionadas en función de los resultados de un test sensorial (presencia o ausencia de olor sexual), mientras Dehnhard y col. (1993) mostraron unos valores máximos de escatol (1,01 µg/g) e indol (0,74 µg/g) superiores. Hansen-Møller (1992) y García-Regueiro y Rius (1998) también describieron unas concentraciones máximas de escatol elevadas (1,71 µg/g y 1,04 µg/g, respectivamente) en muestras de grasa seleccionadas al azar en mataderos comerciales. No obstante, las concentraciones máximas de indol descritas por estos autores (0,31 µg/g y 0,68 µg/g, respectivamente) fueron claramente distintas. Las diferencias entre los resultados descritos pueden ser una consecuencia simultánea de unos criterios de selección de las muestras distintos, de unas características diferentes de la población estudiada y de las metodologías empleadas en la determinación de los compuestos de interés.

Los valores de los coeficientes de correlación altamente significativos observados entre las concentraciones de escatol determinadas mediante el método colorimétrico y el método de HPLC-FN utilizado al considerar el intervalo completo de concentraciones de escatol en estudio (0,04-0,80 equivalentes de escatol) son comparables a los descritos en la bibliografía. Hansen-Møller (1992, 1994) y Hansen-Møller y Andersen (1994) describieron un coeficiente de correlación de 0,975 entre ambas metodologías analíticas, un valor ligeramente superior al obtenido por Hansen y col. (1994), que fue de 0,85.

No obstante, los coeficientes de correlación entre ambas metodologías analíticas presentaron un nivel de significación menor al reducir el intervalo de concentraciones de escatol considerado (0,02-0,12 equivalentes de escatol) e incluir sólo las muestras de grasa pertenecientes a los grupos de concentraciones bajas y medias de escatol. Los resultados mostrados (Tabla 3.23) concuerdan con los expuestos por Hawe y col. (1989), que describieron un coeficiente de correlación relativamente bajo ( $r=0,128$ ) al comparar la concentración de escatol determinada mediante un sistema de cromatografía de gases acoplado a un



detector NPD y los equivalentes de escatol determinados por el método colorimétrico. Sin embargo, la concentración media de escatol determinada en grasa dorsal (48 ng/g) se situó muy próxima al límite de cuantificación del método colorimétrico, que es de 0,02-0,04 equivalentes de escatol (Mørtensen y Sørensen, 1984).

La evaluación de las concentraciones de escatol e indol de las muestras pertenecientes al grupo de concentraciones elevadas (AB y AA) y al grupo de concentraciones bajas (BA y BB) mediante el método de HPLC-FN desarrollado en este trabajo se correspondió con la clasificación previamente establecida. Las mayores concentraciones se observaron en los grupos AB y AA y las menores en los grupos BB y BA. No obstante, las concentraciones de escatol e indol de las muestras pertenecientes al grupo de concentraciones medias (MM) fueron inferiores a las determinadas mediante el método de clasificación previamente establecido ( $<0,10 \mu\text{g/g}$ ). La ausencia de correspondencia en este intervalo de concentraciones entre los resultados obtenidos mediante el método colorimétrico y el método cromatográfico aplicado en este estudio puede estar ocasionada por la presencia de otros compuestos químicos que interfirieron en la reacción colorimétrica desarrollada y provocaron un incremento de los equivalentes de escatol determinados.

La representación gráfica de los valores correspondientes a los equivalentes de escatol frente a la concentración de escatol determinada por HPLC-FN en este estudio evidencia la contribución de otros compuestos en los resultados obtenidos mediante métodos analíticos no específicos. La ecuación de regresión obtenida relaciona los resultados de ambas metodologías (Figura 3.25,  $y=0,7553x - 0,0203$ ) e indica que una muestra de grasa que presentara una concentración de 0,20 equivalentes de escatol y, por tanto, clasificada en el grupo de concentraciones elevadas de escatol presentaría una concentración de  $0,10 \mu\text{g/g}$  según los resultados del método de HPLC-FN y, en consecuencia, pertenecería al grupo de concentraciones bajas de escatol. La contribución del indol en los resultados finales del método colorimétrico se contempla al considerar la ecuación de regresión obtenida en la representación gráfica de los equivalentes de escatol frente a la concentración suma de escatol e indol determinada mediante el método de HPLC-FN desarrollado en este estudio (Figura 3.26,  $y=1,101x - 0,004$ ). En esta ocasión, una muestra de grasa con 0,20 equivalentes de escatol y clasificada en el grupo de concentraciones elevadas de escatol, presentará una concentración de

0,22 µg/g según los resultados del método de HPLC-FN y, por tanto, no modificaría su clasificación. En consecuencia, el método colorimétrico incrementa el contenido de escatol en grasa y la discrepancia entre los resultados de ambas metodologías será más acusada cuanto mayor sea la concentración de indol en el tejido adiposo.

García-Regueiro y col. (1986a) y Tuomola y col. (1996b) también indicaron la contribución del indol en la determinación de los equivalentes de escatol. Hansen-Møller y Andersen (1992) estimaron que aproximadamente el 25% de la concentración de indol determinada mediante un método cromatográfico se incluye en la concentración de escatol expresada en equivalentes de escatol, debido a la menor especificidad del método colorimétrico. Hansen-Møller (1994) evaluó la contribución del indol y escatol en los equivalentes de escatol y corrigió los resultados del método colorimétrico mediante un modelo lineal basado en un programa de análisis multivariante ( $\text{Escatol Colorimétrico} = a \cdot \text{Escatol HPLC} + b \cdot \text{Indol HPLC} + c$ ). Las modificaciones matemáticas efectuadas por este autor mejoraron la correlación entre ambas metodologías analíticas y otorgaron el 75,9% de los resultados del método colorimétrico al escatol y el 44,2% al indol. Del mismo modo, Claus y col. (1997b) corrigieron los resultados del método colorimétrico mediante la sustracción de la concentración de indol, determinada por HPLC-FR según el método descrito por Dehnhard y col. (1993), multiplicada por un factor de 0,4.

El análisis de componentes principales de los resultados obtenidos por las diferentes metodologías de determinación del escatol e indol evaluadas facilitó la observación gráfica de las correlaciones descritas entre los métodos de cromatografía líquida (fase normal y reversa). El mayor porcentaje de muestras de grasa dorsal analizadas con una concentración de escatol superior a la de indol (88,10%) explica la disposición del método colorimétrico junto a las metodologías de determinación de escatol y alejado de las metodologías analíticas del indol, a pesar de la correlación existente. Asimismo, la proyección similar de las variables sobre el eje del componente 1 permite observar la correlación entre las concentraciones de escatol e indol en grasa dorsal descrita en este estudio.

La disposición de las muestras sobre los ejes reflejó que una parte importante de la variabilidad observada (83,34%) era debida a las diferentes concentraciones de indol y escatol de las muestras de grasa analizadas y, por tanto, este componente permite probablemente su diferenciación según la presencia o ausencia de olor

sexual atribuible al contenido de indol y escatol. La capacidad de diferenciar las muestras de grasa pertenecientes a los diferentes grupos de concentraciones establecidos según su contenido en escatol varía en función de los métodos analíticos considerados. La clasificación de las muestras de grasa según los resultados obtenidos mediante la aplicación de métodos inespecíficos (Figura 3.27 A) no permitió la discriminación entre muestras con concentraciones bajas y medias de escatol, aunque estos grupos de muestras si se diferenciaron mediante los resultados del método de cromatografía líquida en fase normal desarrollado en este trabajo de Tesis (Figura 3.27 B).

Por otra parte, aproximadamente un 14% de las variaciones observadas entre las muestras de grasa analizadas (eje componente 2) estuvieron determinadas por la naturaleza del compuesto indólico implicado, escatol u indol. Esta influencia se observa claramente en la clasificación de las muestras de grasa en función de la concentración suma de escatol e indol obtenida mediante HPLC-FN (Figura 3.27 C), cuando se pierde la capacidad de discriminación del método cromatográfico y se obtienen resultados similares a los obtenidos mediante el método colorimétrico.

La concentración de indol ejerce una notable influencia sobre la clasificación de las canales, pero los factores que influyen sobre su concentración en el tejido adiposo no se han evaluado con exactitud. La presencia de un mayor porcentaje de bacterias intestinales capaces de sintetizar indol directamente a partir de triptófano (Jensen y col., 1995a, b) explica la mayor síntesis de indol a partir del aminoácido en una dieta estándar (Agergaard y col., 1998). Sin embargo, una mayor producción de indol no se corresponde generalmente con concentraciones elevadas en el tejido adiposo. La influencia de determinados factores como el pH intestinal y la composición de la dieta que modifican la producción relativa de escatol e indol (Lundström y col., 1988; Jensen y col., 1995 a, b, 1997) no se conoce con precisión, debido al número escaso de trabajos que determinan la concentración de escatol mediante métodos específicos. Sin embargo, la elevada concentración de indol determinada en algunas muestras de grasa analizadas en este estudio puede ser consecuencia de un efecto estacional, ya que los animales se sacrificaron durante la estación de verano, cuando las temperaturas elevadas favorecen la evaporación de una proporción importante del indol presente en las heces y su absorción a través de la piel o inhalación por los pulmones y, en definitiva, su depósito en el tejido adiposo (Hansen y col., 1994).

Los resultados obtenidos en el presente estudio mostraron la falta de especificidad del método colorimétrico para la determinación del escatol en muestras de grasa dorsal de cerdo. La contribución del indol en los resultados obtenidos mediante el método espectrofotométrico y en el desarrollo del olor sexual (Bejerholm y Barton-Gade, 1993; Xue y col., 1996) implica necesariamente la aplicación de métodos analíticos específicos que permitan determinar las concentraciones de indol y escatol en las correctas proporciones y, por tanto, la correcta clasificación de las canales de cerdos enteros de acuerdo las concentraciones de ambos compuestos.

El intervalo de concentraciones de androstenona en grasa dorsal de cerdo obtenido en este estudio mediante GC-MS se situó entre 0,01- 2,03  $\mu\text{g/g}$ . El margen amplio de concentraciones de androstenona determinado se debe, como hemos indicado anteriormente, a la selección previa de las muestras según los resultados del método ELISA con el propósito de asegurar la representación de todas las categorías de concentración de androstenona (baja, alta y media). El porcentaje de muestras de grasa que presentaron una concentración de androstenona inferior al límite de aceptabilidad (0,50  $\mu\text{g/g}$ ) fue del 54,80%, mientras que un 26,18% mostraron una concentración superior a 1,0  $\mu\text{g/g}$ . Los resultados obtenidos son similares a los descritos por Walstra y col. (1999). Bonneau y col. (1992a) mostraron que un 42% de los machos enteros considerados en su estudio presentaron una concentración de androstenona superior a 0,50  $\mu\text{g/g}$ .

La concentración de androstenona de las canales procedentes de hembras fue de 0,01  $\mu\text{g/g}$ , a excepción de una muestra de grasa que presentó una concentración de 0,10  $\mu\text{g/g}$ . En contraposición con estos resultados, DeBrabander y col. (1985) y Hansen-Møller y Andersen (1994) observaron concentraciones de androstenona superiores a 0,25  $\mu\text{g/g}$  en diferentes muestras de grasa procedentes de hembras analizadas en sus estudios. Las concentraciones bajas de androstenona determinadas en este estudio en muestras procedentes de canales de hembras se relaciona con el metabolismo de los animales, ya que la androstenona es una hormona sexual masculina. Sin embargo, su concentración puede aumentar en determinadas condiciones metabólicas o ambientales y ser origen de las diferencias descritas.

Diversos autores describen concentraciones máximas de androstenona superiores a la determinada en este estudio. Lundström y col. (1988) evaluaron la influencia de la dieta en la concentración de androstenona y determinaron un margen de concentraciones de la hormona de 0,01-4,80 µg/g. Anteriormente, Brennan y col. (1986) situaron el intervalo de concentraciones de androstenona entre 0,06-3,42 µg/g en canales de cerdos enteros con un peso de sacrificio de 100-130 kilos. García-Regueiro y Díaz (1989) describieron una concentración máxima de androstenona de 4,70 µg/g en muestras de grasa seleccionadas en función de los resultados de un panel sensorial (presencia o no de olor sexual). Hansen-Møller (1994) describió una concentración máxima de androstenona de 7,67 µg/g en muestras de grasa seleccionadas al azar en un matadero comercial.

Los coeficientes de correlación altamente significativos observados entre las concentraciones de androstenona determinadas mediante el método de GC-MS desarrollado en este trabajo y el método ELISA (Claus y col., 1997a) al considerar el intervalo completo de concentraciones de androstenona en estudio (0,01-3,50 µg/g) fueron comparables a los descritos en la bibliografía (DeBrabander y col., 1986). La reducción del intervalo de concentraciones (0,01-0,62 µg/g) disminuyó ligeramente el coeficiente de correlación entre ambas metodologías sin modificar el nivel de significancia (Tabla 3.32). Hansen-Møller y Andersen (1994) y Claus y col. (1997b) mostraron unos coeficientes de correlación ligeramente superiores ( $r=0,98$  y  $r=0,96$ , respectivamente) al comparar la concentración de androstenona obtenida mediante cromatografía líquida y ELISA.

La evaluación de la concentración media de androstenona determinada mediante el método cromatográfico desarrollado en este estudio fue significativamente superior a 1,0 µg/g en las muestras de grasa pertenecientes a los grupos de concentraciones elevadas de androstenona (BA y AA) e inferior a 0,50 µg/g en las muestras con concentraciones bajas (BB y AB). No obstante, la concentración media de androstenona en las muestras de grasa clasificadas en el grupo de concentraciones medias (MM) fue inferior a la obtenida mediante el método de clasificación ( $<0,50$  µg/g).

De acuerdo con los resultados descritos en la bibliografía (DeBrabander y col., 1986; Hansen-Møller y Andersen, 1994) la ecuación de regresión obtenida al representar gráficamente la concentración de androstenona determinada por ELISA frente a la concentración de androstenona determinada en este trabajo por

GC-MS ( $y=0,6034x - 0,0342$ , Figura 3.29) mostró que el método inmunológico, a pesar de la correlación observada entre ambas metodologías analíticas, tiende a sobrestimar el contenido de androstenona y, por tanto, puede inducir una clasificación de las canales de cerdos enteros errónea. Así por ejemplo, una muestra de grasa con una concentración de androstenona de  $1,0 \mu\text{g/g}$  y clasificada en el grupo de concentraciones elevadas presentaría una concentración de  $0,57 \mu\text{g/g}$  según los resultados de método de GC-MS y, en consecuencia, pertenecería al grupo de concentraciones medias de androstenona.

La ausencia de correspondencia en este intervalo de concentraciones entre los resultados obtenidos mediante el método inmunológico y el método cromatográfico puede estar ocasionada por reacciones inespecíficas en la determinación de la concentración de androstenona mediante ELISA, con los androstenoles u otros esteroides derivados presentes en los extractos grasos (DeBrabander y col., 1986). Claus y col. (1988) mostraron que el anticuerpo utilizado en el método ELISA desarrollado por estos autores presenta la capacidad de reaccionar con el  $5\alpha\text{-An-}3\alpha\text{-ol}$  (8%), el  $5\alpha\text{-An-}3\beta\text{-ol}$  (12%) y la 4,16-androstadien-3-ona (80%), intermediario de la biosíntesis de la androstenona en los testículos.

Patterson (1968b) atribuyó el olor a almizcle (musk-like) identificado en las muestras de grasa dorsal a la presencia de  $5\alpha\text{-An-}3\alpha\text{-ol}$  y Bonneau y col. (1992) indicaron que algunas variaciones observadas en la puntuación sensorial de las muestras de grasa evaluadas por un panel test se explican por la posible contribución de los androstenoles en el desarrollo del olor sexual. Los intervalos de concentraciones de los androstenoles obtenidos en este estudio en muestras de grasa dorsal mediante GC-MS fueron de  $0,01\text{-}0,56 \mu\text{g/g}$  para el  $5\alpha\text{-An-}3\alpha\text{-ol}$  y  $0,01\text{-}0,36 \mu\text{g/g}$  para el  $5\alpha\text{-An-}3\beta\text{-ol}$ . García-Regueiro y Díaz (1989) mostraron una concentración similar de  $5\alpha\text{-An-}3\alpha\text{-ol}$ , aunque superior de  $5\alpha\text{-An-}3\beta\text{-ol}$  ( $1,80 \mu\text{g/g}$  en comparación a  $0,36 \mu\text{g/g}$ ). La concentración suma de ambos androstenoles determinada en este estudio se situó en el intervalo de  $0,02\text{-}0,92 \mu\text{g/g}$ , resultado parecido al obtenido por Mågård y col. (1995). Brennan y col. (1986) describieron una concentración total de androstenoles ligeramente superior ( $1,8 \mu\text{g/g}$ ) a la descrita en este estudio, posiblemente a causa del mayor peso de sacrificio de los animales evaluados (100-130 kilos).

La ecuación de regresión correspondiente a la representación gráfica de la concentración suma de androstenona y androstenoles obtenida por GC-MS en el presente estudio frente a la concentración de la hormona determinada mediante el método inmunológico ( $y = 0,6617 x + 0,0552$ , Figura 3.30) evidencia la contribución de las concentraciones de ambos androstenoles en los resultados del método ELISA. En esta ocasión, una muestra de grasa con 1,0  $\mu\text{g/g}$  de androstenona y clasificada en el grupo de concentraciones elevadas presentará, según los resultados del método de GC-MS, una concentración ligeramente superior a la obtenida al considerar únicamente la concentración de androstenona (0,72  $\mu\text{g/g}$  en comparación a 0,57  $\mu\text{g/g}$ ), aunque pertenecería al grupo de concentraciones medias de la androstenona. Estos resultados implican, necesariamente, la presencia de otros compuestos en los extractos de grasa analizados que reaccionen inespecíficamente con los anticuerpos utilizados e incrementen el contenido real de androstenona en el tejido adiposo.

Las correlaciones altamente significativas observadas en este trabajo entre la concentración de androstenona y las concentraciones de los androstenoles en las muestras de grasa analizadas implica que las discrepancias observadas entre ambas metodologías serán más acusadas cuanto mayor sea la concentración de androstenona y, al mismo tiempo, también indican una menor contribución de estos compuestos en el desarrollo del olor sexual en las muestras de grasa con concentraciones bajas de androstenona y clasificadas con defecto sensorial por los miembros de un panel test. Los androstenoles ( $5\alpha\text{-An-}3\alpha\text{-ol}$  y el  $5\alpha\text{-An-}3\beta\text{-ol}$ ) son producto de la reducción de la androstenona y, por tanto, resulta lógico pensar que concentraciones elevadas de androstenona se corresponderán con concentraciones elevadas de  $5\alpha\text{-An-}3\alpha\text{-ol}$  y  $5\alpha\text{-An-}3\beta\text{-ol}$ . Sin embargo, en estas condiciones la contribución de los androstenoles no modificará la clasificación de las canales que se efectuará correctamente en el grupo de concentraciones elevadas en función del contenido de androstenona.

La correlación observada en este trabajo entre la concentración de androstenona y la concentración suma de los androstenoles fue también descrita por Brennan y col. (1986). No obstante, en los estudios realizados por García-Regueiro y Díaz (1989) y Mågård y col. (1995) la concentración de androstenona no se correlacionó con la concentración total de los androstenoles en grasa. La ausencia de correlación observada por Mågård y col. (1995) pudo estar ocasionada por una extracción incompleta de los androstenoles mediante el sistema de extracción de

fluidos en el estado supercrítico con CO<sub>2</sub>, debido a los compuestos de características más polares que la androstenona.

Por otra parte, Brennan y col. (1986) observaron que la acumulación de estos compuestos en grasa seguía unas proporciones relativamente fijas (2,2:1) y sugirieron que la cantidad de androstenona metabolizada y liberada de los testículos de los animales, en forma de los correspondientes androstenoles, constituye una proporción constante de la androstenona liberada, aproximadamente un 45% de la concentración total. No obstante, las concentraciones de androstenona y androstenoles del tejido adiposo determinadas en el presente trabajo de Tesis mantuvieron una relación variable, resultados similares a los descritos por García-Regueiro y Díaz (1989).

Las concentraciones de esteroides en el tejido adiposo de cerdos varían conforme la edad de los animales y dependen de la actividad endocrina de los testículos y Booth (1975) describió un incremento en la intensidad de biosíntesis del 5 $\alpha$ -An-3 $\beta$ -ol en los cerdos adultos. En consecuencia, la síntesis de androstenoles puede incrementarse progresivamente durante el periodo de crecimiento de los animales y ser reflejo de su desarrollo sexual. Así, la síntesis de androstenoles representaría una proporción constante de la concentración de androstenona en cerdos adultos (peso superior), pero presentar una elevada variabilidad en animales que no hayan alcanzado la madurez sexual.

García-Regueiro y Díaz (1989) describieron una mayor concentración de 5 $\alpha$ -An-3 $\beta$ -ol en el tejido adiposo porcino. No obstante, la concentración de 5 $\alpha$ -An-3 $\alpha$ -ol determinada en este estudio fue superior a la de su epímero en todas las muestras de grasa evaluadas. El número limitado de trabajos que evalúan las concentraciones de androstenoles en el tejido adiposo porcino dificulta establecer el origen de las diferencias observadas.

El análisis de componentes principales de las variables correspondientes a los diferentes métodos evaluados para la determinación de la androstenona y de los androstenoles en muestras de grasa dorsal permite la observación gráfica de la correlación descrita entre el método ELISA y los métodos cromatográficos (HPLC-FR y GC-MS). La proyección de las variables sobre el eje del componente 1 mostró la correlación existente entre las concentraciones de androstenona y ambos androstenoles en grasa dorsal.



La disposición sobre los ejes de las muestras de grasa evaluadas en este estudio reflejó que la mayor variabilidad observada (88,05%, componente 1) estuvo ocasionada por las diferentes concentraciones de androstenona y androstenoles de las muestras analizadas y, por tanto, que este componente probablemente permite su diferenciación según la presencia o ausencia de olor sexual atribuible al contenido de androstenona y androstenoles. La capacidad de discriminar las muestras de grasa pertenecientes a los diferentes grupos de concentraciones establecidos según el contenido de androstenona varía en función de los métodos analíticos considerados. La clasificación de las muestras de grasa según los resultados obtenidos mediante la aplicación de métodos inespecíficos (Figura 3.31, A) no permitió una diferenciación clara de las muestras de grasa con concentraciones medias y bajas de androstenona, aunque estos grupos de muestras se discriminaron al considerar la clasificación según los resultados del método de cromatografía de gases presentado en este estudio (Figura 3.31, B).

La variabilidad de las muestras atribuible a la naturaleza de los esteroides evaluados, androstenona y androstenoles, se determinó en el componente 2 (7,50%). Sin embargo, la capacidad de discriminar algunas muestras con concentraciones medias de androstenona se perdió al considerar la concentración suma de androstenona y androstenoles obtenida en este estudio mediante GC-MS (Figura 3.31, C) y pone de manifiesto la contribución de los androstenoles en la sobreestimación del método ELISA. Estos resultados corroboran la presencia de otros compuestos en la grasa de cerdo que no son determinados mediante los métodos cromatográficos específicos para la androstenona y los androstenoles.

Por último, de acuerdo con los resultados obtenidos por García-Regueiro y Díaz (1989), Weiler y col. (1997), Annor-Frempong y col. (1997d) y Walstra y col. (1999), las concentraciones de escatol e indol no se correlacionaron con el contenido de androstenona. En realidad los compuestos indólicos y los esteroides son sustancias químicas de naturaleza diferente sintetizados a partir de rutas metabólicas distintas y cuya concentración en el tejido adiposo está influida por diversos factores, siendo los relacionados con el propio animal los que se relacionan más significativamente con la concentración de androstenona.

Por otra parte, los factores relacionados con los sistemas de producción de los cerdos pueden modificar el contenido en escatol y androstenona del tejido adiposo. Los criterios considerados para la selección de las muestras de grasa y las

características de las poblaciones de cerdos evaluadas (peso de sacrificio, alimentación, genotipo) influyen en las concentraciones de escatol y androstenona de los animales e inducen que los resultados entre los diferentes estudios desarrollados no sean comparables, independientemente de los métodos analíticos aplicados para determinar las concentraciones de los compuestos implicados en el olor sexual.

Las concentraciones de escatol, indol, androstenona y androstenoles de las muestras de grasa analizadas no se correlacionaron con las características conformacionales de las canales evaluadas, peso de sacrificio (52-96 kilos) y porcentaje de magro (52,0-64,5%). La ausencia de correlación entre los parámetros descritos concuerda con los resultados de LeDenmat y col. (1993), Lundström y Malmfors (1993), Hennesy y col. (1995a) y Tuomola y col. (1996b). No obstante, Walstra y col. (1999) observaron en un estudio reciente que la concentración de escatol aumenta ligeramente con el peso y disminuye con el porcentaje de magro de las canales, mientras Moss y col. (1997) describieron diferencias significativas entre el contenido de escatol de cerdos sacrificados a diferentes pesos (70-100 kilos) al comparar los resultados correspondientes a los pesos extremos del intervalo considerado.

Paralelamente, Walstra y Garssen (1995) y Walstra y col. (1999) también observaron un ligero incremento en el contenido de androstenona con el peso de sacrificio de los animales y Von Seth y col. (1995) mostraron que la concentración de la  $5\alpha$ -An en cerdos sacrificados a 70, 90, 110 y 130 kilos presenta diferencias significativas entre los pesos extremos.

Los resultados obtenidos en los diferentes estudios considerados indican que las concentraciones de los compuestos responsables del olor sexual en las canales de cerdos enteros sacrificados a pesos bajos evitan el desarrollo del defecto sensorial, principalmente los niveles de androstenona. No obstante, deben tenerse en cuenta otros factores, como la alimentación y la raza de los cerdos, que pueden influir notablemente en la producción de escatol por parte de las bacterias intestinales y en el desarrollo sexual de los animales (Lundström y col., 1988; Babol y col., 1996; Jensen y col., 1995b).

El análisis de componentes principales de las variables correspondientes a los diferentes métodos evaluados para la determinación de escatol y androstenona (Figura 3.32) reflejó que un 55,72% de la variabilidad observada (eje componente 1) era debida a las diferentes concentraciones de indol, escatol, androstenona y androstenoles que presentaban las muestras de grasa analizadas y, por tanto, este componente probablemente permite diferenciar las muestras con olor sexual atribuible al contenido de escatol, indol, androstenona y androstenoles. No obstante, las muestras de grasa evaluadas en este estudio presentaron una elevada variabilidad al considerar simultáneamente la presencia de los compuestos indólicos y esteroides y, por tanto, fue imposible diferenciar las muestras según presentaran una mayor concentración de indol (en comparación al escatol) o de androstenoles (en comparación a la androstenona). De este modo, aproximadamente un 30% de las variaciones observadas entre las muestras analizadas (eje componente 2) se explicaron en función de la mayor presencia de indol/escatol o de androstenona/androstenoles en el tejido adiposo.

La principal fuente de variación entre las muestras de grasa se eliminó al no considerar las muestras pertenecientes al grupo de concentraciones elevadas de escatol y androstenona (HH). De este modo, la mayor variabilidad (aproximadamente el 50%) se reflejó en el eje del componente 1 (Figura 3.33) y permitió la diferenciación de las muestras de grasa según presentaran concentraciones elevadas de los compuestos indólicos o concentraciones elevadas de androstenona y/o androstenoles.

De acuerdo con los resultados previamente evaluados, la capacidad de discriminar las diferentes categorías de concentraciones de escatol y androstenona depende de los métodos analíticos considerados. La clasificación de las muestras de grasa según los resultados obtenidos mediante la aplicación de métodos inespecíficos (Figura 3.32 A) permitió la discriminación entre las muestras de grasa que presentaron concentraciones elevadas de alguno de los compuestos implicados (grupos AB y BA) o de ambos (AA), pero no se diferenciaron las muestras pertenecientes al grupo de concentraciones medias. Sin embargo, este grupo de muestras se diferenciaron del grupo de concentraciones bajas y de las hembras cuando la clasificación se realizó según los resultados de los métodos cromatográficos desarrollados en el presente trabajo de Tesis (Figura 3.32 B).

La contribución del indol, de los androstenoles y de otros compuestos presentes en la grasa en la clasificación de las muestras según métodos inespecíficos se observa en la Figura 3.32 C donde la clasificación de las muestras en función de las concentraciones suma de indol-escatol y androstenona-androstenoles determinadas por los métodos de HPLC-FN y GC-MS desarrollados en este estudio pierde la capacidad de discriminación que los métodos cromatográficos presentaban anteriormente.

La evaluación de las muestras de grasa consideradas en este estudio mediante métodos cromatográficos ha mostrado que las canales de cerdos enteros pueden ser clasificadas de forma incorrecta en los diferentes grupos de concentraciones de escatol y androstenona al aplicar métodos de análisis rápidos y no específicos (colorimétricos y ELISA) (Figura 3.34). La automatización y adaptación que presenta el método colorimétrico para el análisis de escatol en la línea de sacrificio, junto a la rapidez y capacidad de muestras de ambos métodos analíticos son los principales motivos que indujeron su utilización en la clasificación previa de las muestras de grasa.

De acuerdo con los resultados obtenidos por García-Regueiro y Díaz (1989), Weiler y col. (1997), Annor-Frempong y col. (1997d) y Walstra y col. (1999), la ausencia de correlación observada en este estudio entre las concentraciones de los compuestos relacionados con el olor sexual implica, necesariamente, determinar de forma específica las concentraciones de escatol y androstenona para evaluar correctamente la presencia del defecto sensorial en las canales de cerdos enteros.

Por último, se debe señalar que el reciente desarrollo de nuevas tecnologías basadas en los sensores de gas o en la pirólisis acoplada a la espectrometría de masas representa una gran posibilidad para la detección on-line del olor sexual. Resultados recientes parecen indicar que la nariz artificial presenta la capacidad de simular la respuesta de un panel sensorial al olor sexual, aunque es necesario el desarrollo de nuevos sensores que permitan una mayor sensibilidad y especificidad para poder asegurar su aplicabilidad a nivel industrial.

#### **4.3. Análisis de indol y escatol en muestras de músculo longissimus dorsi porcino. Implicaciones en la correcta clasificación de las canales de cerdos enteros**

El desarrollo de un método analítico para determinar las concentraciones de indol y escatol en muestras de músculo longissimus dorsi permitió evaluar la concentración de estos compuestos en el tejido muscular. Los trabajos consultados en la bibliografía en este sentido han sido nulos y en todos los estudios realizados se supone que existe una correlación directa entre las concentraciones de escatol y/o androstenona en el tejido adiposo y la valoración sensorial de distintas piezas de la canal. La concentración de los compuestos implicados en el olor sexual en el tejido muscular depende en parte del contenido graso del músculo, que aumenta con el peso de sacrificio de las canales y está influido por diversos factores, como la raza y la alimentación, entre otros.

La presencia de agua en el músculo dificultó el tratamiento de las muestras y el análisis de indol y escatol. La partición de los extractos obtenidos mediante una solución salina, aunque alargó el tiempo de análisis y el consumo de disolventes, fue el procedimiento aplicado para eliminar el agua extraída.

El porcentaje de recuperación en el tejido muscular descrito en este estudio para el indol (83,63%) fue inferior al del escatol (94,45%). La causa de esta diferencia puede ser debida a una extracción selectiva de los compuestos implicados durante la extracción líquido-líquido o la menor volatilidad del indol durante los procedimientos de evaporación aplicados. Los porcentajes de recuperación del indol y escatol obtenidos en este estudio fueron inferiores a los descritos por García-Regueiro y Rius (1998) en muestras de grasa dorsal de cerdo (100,27% y 99,57%), aunque similares a los porcentajes descritos por García-Regueiro y Díaz (1989) que aplicaron un procedimiento de purificación mediante columnas de florisil.

La comparación estadística entre las concentraciones de los compuestos indólicos estudiados indica la existencia de una correlación significativa entre las concentraciones de indol y escatol en los tejidos evaluados, resultados similares a los descritos en la bibliografía. Tuomola y col. (1996b, c) observaron la correlación entre las concentraciones de estos compuestos en el tejido adiposo, glándulas

salivares y suero. Claus y col. (1994) y Tuomola y col. (1996b) mostraron que el contenido en escatol del tejido adiposo se relaciona directamente con la concentración plasmática de este compuesto. La relación observada en los diferentes estudios entre las concentraciones de los compuestos indólicos en distintos tejidos y glándulas corporales indica la capacidad que presentan estos compuestos de incorporarse al metabolismo del animal. No obstante, los resultados obtenidos en este estudio muestran que la mayor concentración de indol y escatol detectada en el tejido adiposo refleja que los compuestos indólicos estudiados se depositan principalmente en la grasa debido a sus características lipofílicas.

La comparación entre las concentraciones de escatol y androstenona obtenidas mediante diferentes técnicas analíticas y los resultados del panel de especialistas y test de consumidores permite evaluar los umbrales de detección sensorial del olor sexual. Lundström y col. (1988) mostraron que la concentración de escatol en grasa se correlaciona positivamente con las notaciones sensoriales de la grasa ( $r=0,65$ ) y del lomo ( $r=0,68$ ). No obstante, los resultados obtenidos en este estudio implican que las concentraciones de escatol y androstenona difieren entre tejidos. El tejido muscular presenta una menor concentración de escatol que la grasa dorsal, aunque diversos factores como el metabolismo muscular y la cantidad de grasa infiltrada y de recubrimiento influyen en su concentración. De acuerdo con estos resultados, Hawe y col. (1989) mostraron que las concentraciones de indol y escatol difieren entre el tejido adiposo procedente de diferentes zonas del animal (cuello, espalda, panza y riñón) y Hansen y col. (1994) observaron que el escatol e indol no se distribuyen de forma uniforme en el tejido adiposo subcutáneo, de forma que la capa inferior de la grasa subcutánea presenta mayores concentraciones de escatol e indol, aunque factores ambientales y factores relacionados con la higiene de los animales pueden modificar estos parámetros.

La notable diferencia observada entre las concentraciones de escatol e indol de ambos tejidos (adiposo y muscular) indica que la concentración en grasa de estos compuestos no siempre es representativa de la concentración media de los músculos más magros de la canal porcina. Por otra parte, el porcentaje de grasa infiltrada y de recubrimiento que presenten los músculos influirá en las concentraciones de indol y escatol en el conjunto magro-grasa y, por tanto, en la respuesta de los consumidores frente al olor sexual.

#### 4.4. Análisis de los porcentajes de ácidos grasos totales en muestras de grasa dorsal porcina

La información que se obtiene de los porcentajes de ácidos grasos totales presenta el inconveniente de su excesiva generalidad. La mayoría de trabajos descritos en la bibliografía no relacionan los porcentajes de los ácidos grasos totales con la intensidad e incidencia del olor sexual en las canales de cerdos enteros. Los trabajos consultados describen básicamente la influencia del sexo y de la castración de los animales en la composición y características físicas de la grasa (Desmoulin y col., 1982a; Desmoulin, 1983). El mayor porcentaje de magro que presentan las canales de cerdos enteros es uno de los principales motivos por los que se intenta potenciar su producción. No obstante, la presencia de una determinada cantidad de grasa en la canal, especialmente intramuscular e intermuscular, es necesaria para el desarrollo de las notaciones sensoriales asociadas a la carne de cerdo.

La grasa subcutánea representa aproximadamente un 66% de la grasa total en la especie porcina y su grado de insaturación es superior al de otras especies, aunque este parámetro depende de diversos factores, como la alimentación y la raza de los cerdos (Desmoulin y col., 1982; Desmoulin, 1983).

Las diferencias entre los porcentajes de los ácidos grasos totales de muestras de grasa clasificadas previamente en función de las concentraciones de escatol y androstenona fueron poco relevantes. El resultado más destacado fue la mayor composición en ácido decanoico de las muestras con concentraciones medias de escatol y androstenona (MM) y en ácido pentadecanoico de las muestras pertenecientes a los grupos de concentraciones bajas y medias de escatol y androstenona (BB y MM). El olor desagradable de estos ácidos grasos (agrio, queso, ropa sucia, jabón) pudo originar el desarrollo de *off-flavours* en las muestras de grasa evaluadas, aunque como se describe en la Tabla 3.39 no se observaron diferencias significativas entre los porcentajes de ácido decanoico y pentadecanoico de las muestras clasificadas con distinta valoración sensorial (presencia o ausencia de olor sexual).

El análisis de correlación realizado mostró que las concentraciones de escatol, indol, androstenona y androstenoles se correlacionaron negativamente con los

porcentajes de los ácidos grasos decanoico y pentadecanoico. Además, el ácido C20:3 (n-6), que al igual que el ácido pentadecanoico presentaron un porcentaje significativamente superior en las muestras pertenecientes al grupo de concentraciones bajas de escatol y androstenona (BB), también se correlacionó negativamente con las concentraciones de los compuestos implicados en el olor sexual.

En este sentido, Desmoulin y col. (1981) y Desmoulin (1983) mostraron que las notaciones sensoriales relacionadas con el olor sexual se correlacionan positivamente con el contenido de androstenona y negativamente con el contenido de los ácidos grasos poliinsaturados C18:3 y C20:1, mientras que estos compuestos se correlacionan positivamente con el aroma y el sabor de la carne procedente de canales de cerdos enteros. Estos resultados se repitieron al evaluar sensorialmente la carne procedente de canales de cerdos castrados y hembras, aunque en esta ocasión se observó que el contenido en ácido palmítico se relaciona con una evaluación negativa del aroma de las canales.

Desmoulin y col. (1982) observaron que las canales procedentes de cerdos enteros, castrados y hembras presentan una composición diferente en ácidos grasos. Según los resultados obtenidos por este autor (Desmoulin, 1983), el 60% de los ácidos grasos totales determinados en animales sacrificados a 90 kilos eran insaturados. Los resultados obtenidos en este estudio indicaron que el porcentaje suma de los ácidos grasos polinsaturados, que no presentó diferencias significativas entre los diferentes grupos de muestras evaluados, fue superior en las canales procedentes de machos enteros clasificadas en función de las concentraciones de escatol y androstenona. No obstante, el porcentaje suma de los ácidos grasos saturados fue significativamente superior en el grupo de muestras procedentes de canales hembras.

El mayor grado de insaturación observado en cerdos enteros se relacionó con la mayor proporción de ácido oleico (C18:1) y linoleico (C18:2) y con una menor proporción de ácido palmítico (C16:0) y esteárico (C18:0). De acuerdo con estos resultados, el porcentaje de C18:2 obtenido en el presente estudio fue superior en las canales procedentes de cerdos enteros. El porcentaje de C18:0 fue significativamente superior en las muestras de grasa procedentes de canales hembras, que presentaron un mayor porcentaje de C16:0 (22,30%) en comparación a las muestras de cerdo entero.



Desmoulin (1983) mostró también que la relación entre los ácidos grasos insaturados y saturados era significativamente superior en los machos enteros. En desacuerdo con estos resultados, las muestras de grasa procedentes de canales de hembras y las muestras clasificadas con concentraciones medias de escatol y androstenona presentaron una relación entre las sumas de los porcentajes de los ácidos grasos poliinsaturados y saturados significativamente inferior al resto de grupos evaluados (Tabla 3.36).

Los mecanismos de oxidación conducen a la formación de diferentes compuestos volátiles en la grasa, que participan notablemente en el desarrollo del aroma final de un producto cárnico. Resulta evidente que la grasa procedente de canales de machos enteros presenta una mayor susceptibilidad a la degradación oxidativa, debido a una mayor proporción de ácidos grasos insaturados y poliinsaturados. La comparación entre los porcentajes medios de los ácidos grasos totales de las muestras de grasa clasificadas previamente según la evaluación sensorial de un panel test indica que los porcentajes medios significativamente superiores del ácido oleico y de la suma de los ácidos grasos insaturados en las muestras con olor sexual explican la aparición de olores desagradables (*off-flavours*) en estas muestras debidos a los procesos oxidativos de la grasa.

#### **4.5. Análisis de los compuestos volátiles en muestras de grasa dorsal porcina mediante técnicas de Head Space**

La caracterización del aroma de un producto alimentario es un procedimiento complejo porque en la mayoría de las ocasiones está definido por la presencia de varios compuestos y por su posible interacción. Los principales factores que determinan la detección de un determinado aroma son la estructura química y la concentración de las diferentes sustancias aromáticas, el tipo de alimento y la sensibilidad de cada individuo.

Los mecanismos de oxidación lipídica son los responsables del desarrollo de aromas desagradables (*off-flavours*), generalmente de tipo rancio, que provocan una respuesta negativa por parte de los consumidores. Berdagué y col. (1993b) evaluaron los volátiles procedentes de productos curados y describieron que el 60% de los compuestos aislados eran productos de la oxidación lipídica. No obstante, un cierto grado de rancidez resulta deseable en el desarrollo de las

características sensoriales de determinados productos alimentarios (mantequilla, queso, jamón curado). Del mismo modo, la oxidación lipídica conlleva una reducción del tiempo de vida del producto alimentario, a consecuencia de los cambios de color, textura y consistencia y a la pérdida del valor nutritivo de los alimentos.

Los aldehidos son los principales compuestos generados en las reacciones de oxidación de los lípidos y contribuyen, en mayor medida, al aroma final de un producto alimentario, debido a los bajos umbrales de olfacción y al elevado porcentaje de formación que presentan durante el proceso oxidativo. En general, los aldehidos saturados de cadena corta (hasta 5 átomos de carbono) contribuyen a aromas irritables y punzantes, los de cadena media (C6-C9) son los responsables de los aromas a grasa, sebo y amargo y los de cadena larga a aromas frutales (Kochhar, 1993).

La oxidación lipídica también genera la formación de otras familias de compuestos químicos, como: alcanos, alquenos, ácidos, cetonas, alcoholes, ésteres y furanos, sustancias que presentan notaciones sensoriales muy diversas (grasa, rancio, metálico, frutal, hierba) en función de la estructura molecular y de la posición de los dobles enlaces (Kochhar, 1993). Las cetonas y aldehidos insaturados son susceptibles a reacciones de oxidación posteriores que generan la aparición de nuevos compuestos que también contribuirán al aroma final del producto alimentario. La descomposición de los compuestos no volátiles generados a consecuencia de la autooxidación de la grasa (hidroperóxidos, peróxidos, diperóxidos) contribuye a las notaciones sensoriales del conjunto de compuestos volátiles formados.

Sin embargo, algunos compuestos pueden provenir de la acción de microorganismos a través de procesos fermentativos o ser producto de la proteólisis a través de las degradaciones de Strecker, así como derivados de las reacciones de Maillard e incluso pueden tener un origen alimentario o tecnológico (García y col., 1991; Berdagué y col., 1991a, b; Ventanas y col., 1992; López y col., 1992; Viallon y col., 1992).

La gran mayoría de los compuestos volátiles que participan en el desarrollo del aroma son liposolubles y se depositan en la grasa, bien porque se hayan originado en ella a partir de la oxidación de lípidos y fracciones proteicas o por migración desde el interior del músculo.

Las familias de compuestos extraídas en este estudio mediante técnicas de *Head Space* dinámico, así como los volátiles que las componen, no difieren en gran medida de los obtenidos por otros autores en grasa de jamón curado (Berdagué y García, 1990; López y col., 1992; Berdagué y col., 1991b; Viallon y col., 1992; Sabio y col., 1998; Ruiz y col., 1999; Timón, 1999). El perfil de volátiles obtenido depende mayoritariamente de la capacidad y selectividad de la técnica analítica empleada y, más concretamente, del tiempo de purga, que determina la obtención de los compuestos de menor volatilidad y concentración.

Los aldehídos, producto de la autooxidación de lípidos, representaron cuantitativamente la mayor parte de compuestos identificados mediante la técnica de *Head Space* dinámico y su contribución al aroma final del producto puede ser significativa dado su bajo umbral de olfacción. Por ejemplo, el 6trans-nonenal presenta un umbral de olfacción de 5 µg/kg y un umbral de detección gustativa de 0,3 µg/kg. La mayoría de aldehídos identificados en el jamón curado presentan un aroma característico a sebo, grasa o aceite que generalmente contribuye al característico aroma a rancio del jamón (López y col., 1992; Ruiz y col., 1999).

El hexanal resultó ser el aldehído mayoritario en las muestras de grasa analizadas en el presente estudio, resultados similares a los descritos por García y col. (1991), López y col. (1992) y Sabio y col. (1998) en jamón ibérico. El hexanal presenta un umbral de olfacción bajo (0,32 mg/kg en aceite de parafina) y sus notaciones sensoriales (fuerte, rancio o desagradable) influyen notablemente en el aroma de la grasa (Berdagué y col., 1991a; Saxby, 1993; Timón, 1999). El análisis estadístico realizado no mostró diferencias significativas entre la concentración media de este compuesto según la valoración sensorial de un panel test. No obstante, las concentraciones medias de heptanal, octanal y nonanal (aldehídos que presentan notaciones sensoriales similares a las del hexanal) significativamente superiores en las muestras de grasa clasificadas con olor sexual explicarían el desarrollo de aromas desagradables en estas muestras y la notable incidencia que ejercieron en la valoración del olor sexual al ser detectados por los miembros del panel. El octanal presenta el mismo umbral de olfacción que el hexanal (0,32 mg/kg), mientras que los umbrales de detección para el heptanal y nonanal son 3,2 ng/kg y 13,5 ng/kg, respectivamente (Kochhar, 1993).

Las concentraciones significativamente superiores de los aldehídos evaluados en el presente estudio en muestras de grasa clasificadas previamente con

concentraciones bajas de escatol y androstenona (BB) parece indicar una mayor susceptibilidad a la oxidación frente a condiciones desfavorables de algunas de las muestras de grasa evaluadas, como por ejemplo un sistema de envasado defectuoso. En estas circunstancias el grado de rancidez de las muestras podría ser excesivo y afectar la calidad sensorial de la carne. De igual modo, la concentración total de aldehidos significativamente superior de las muestras pertenecientes al grupo de concentraciones BB y clasificadas con defecto sensorial según los resultados del panel test (Tabla 3.53) podría explicar la respuesta sensorial negativa en este grupo de muestras, a pesar de las bajas concentraciones de escatol y androstenona descritas. Sin embargo, este grupo de muestras no presentaron unos porcentajes superiores de ácidos grasos insaturados (oleico, linoleico, araquidónico), compuestos a partir de los que pueden formarse los distintos aldehidos (López y col., 1992). Los aldehidos insaturados son susceptibles a reacciones de oxidación posteriores que contribuyen a la generación de nuevos compuestos volátiles. Por ejemplo, la autooxidación a temperatura ambiente del 2,4-decanial produce una mezcla compleja de compuestos volátiles, entre los que se encuentran otros aldehidos (butenal, hexanal, 2-hexenal, 2-octenal) junto a compuestos de diferente naturaleza química, como el benzaldehido, furano, etanol, benceno y ácido hexanoico (Kochhar, 1993).

Los ácidos grasos de cadena corta se han descrito en algunos trabajos como compuestos volátiles que originan aromas específicos y desagradables en diferentes productos alimentarios (Cramer, 1983; Ha y Lindsay, 1991a; Berdagué y col., 1991a, 1993a; López y col., 1992; Kochhar, 1993). Según cita Jeon (1993), la presencia de estos compuestos en algunas clases de quesos (queso de *Cheddar*) tiene un papel importante en el desarrollo de su aroma característico. No obstante, algunos ácidos grasos presentan un umbral de detección elevado y, en muchas ocasiones, no se presentan a concentraciones suficientes para contribuir al desarrollo de *off-flavours*. Por ejemplo, el ácido decanoico presenta un umbral gustativo de 200 mg/kg en aceite vegetal y el ácido láurico de 700 mg/kg.

Las rutas de síntesis propuestas para explicar la formación de los ácidos de cadena corta son diversas: oxidación de ácidos grasos de cadena larga, degradación térmica de los ésteres, hidrólisis de triglicéridos y autooxidación de aldehidos y cetonas (Berdagué y col., 1991b; Kochhar, 1993).

Las concentraciones medias de ácido hexanoico y heptanoico significativamente superiores observadas en las muestras de grasa clasificadas previamente con olor sexual según la valoración sensorial del panel test pueden relacionarse con el desarrollo de aromas desagradables, que en determinadas circunstancias podrían recordar y/o confundirse con el olor sexual. El ácido hexanoico se caracteriza por presentar un umbral gustativo en muestras de aceite vegetal de 2,5 mg/kg y un aroma particular, similar al que presenta el ácido heptanoico, que se describe como rancio, sudor y penetrante (Jeon, 1993; Aldrich, 1998), descriptores sensoriales utilizados por los miembros de un panel test y test de consumidores para evaluar y describir la presencia de olor sexual en muestras de grasa porcina.

La contribución del ácido octanoico al aroma final de un producto es muy pequeña, dado que presenta un umbral gustativo de 350 mg/kg (Jeon, 1993). No obstante, la presencia del ácido 4-metiloctanoico en el tejido adiposo se ha relacionado con el característico olor a lana asociado a la carne de cordero (Rousset-Akrim y col., 1997; Young y col., 1997).

Por otra parte, estos autores (Young y col., 1997) mostraron que los miembros de un panel test asociaron la presencia del ácido 4-metilnonanoico, junto a la del escatol, al aroma descrito como animal. La concentración media del ácido nonanoico significativamente superior en las muestras de grasa clasificadas en los grupos de concentraciones elevadas de escatol (AA y AB) indicaría que este ácido puede estar relacionado metabólicamente con la síntesis bacteriana de escatol en el intestino y contribuir al desarrollo de aromas desagradables, dado que sus atributos sensoriales se confunden con la presencia de escatol. De acuerdo con estos resultados, la concentración del ácido nonanoico se correlacionó significativamente ( $r= 0,625$ ,  $P<0,001$ ) con la concentración de escatol. En este sentido, Ha y Lindsay (1991a) describieron la producción intestinal de ácido 3-metilbutanoico a través de fermentaciones intestinales, compuesto que podría contribuir significativamente al desarrollo de *off-flavours* en la carne porcina, dado que sus atributos sensoriales se han definido como sudor, heces y olores pútridos (Aldrich, 1998).

Los alcoholes, en general, presentan un umbral de olfacción superior al de los aldehidos y su influencia en el aroma global del producto alimentario es menor. No obstante, algunos alcoholes insaturados y cíclicos, como la geosmina, presentan unos umbrales de detección bajos (0,05 µg/litro en soluciones acuosas) que pueden provocar algunos problemas en la industria alimentaria.

La concentración media de 1-octen-3-ol significativamente superior descrita en este estudio en muestras de grasa clasificadas según los resultados de un panel test con olor sexual tiene cierto interés, debido a que su aroma se ha descrito como a moho, setas o champiñón y, por tanto, puede provocar una respuesta negativa por parte de los consumidores. El umbral de detección del 1-octen-3-ol en aceite es relativamente bajo (0,0075 mg/kg) (Kochhar, 1993). La presencia de 1-octen-3-ol también se ha descrito en numerosos estudios realizados en jamón curado (Berdagué y col., 1991a, 1993a; Díaz, 1993; Sabio y col., 1998; Timón, 1999). Asimismo, se considera que el 1-octen-3-ol es el responsable del aroma a setas identificado en la grasa de leche deteriorada (Kochhar, 1993).

Las cetonas alifáticas, producto de la autooxidación de los ácidos grasos insaturados, también contribuyen al desarrollo de olores desagradables en aceites y productos alimentarios. La 2heptanona se ha identificado como uno de los compuestos responsables del aroma a moho que se desarrolla en el aceite de cacahuete (Saxby, 1993). La vía de síntesis de las metilcetonas se ha descrito ampliamente en la bibliografía, debido a que son los compuestos responsables del aroma de la mayoría de quesos azules. La presencia de 2heptanona en los productos cárnicos, descrita por Berdagué y García (1990), Berdagué y col. (1991a) y Sabio y col. (1998), provoca el desarrollo de aromas desagradables que recuerdan al queso azul y a almendras rancias. De acuerdo con estos resultados, la concentración de 2-heptanona significativamente superior en muestras de grasa clasificadas con olor sexual se podría relacionar con la presencia de otros defectos sensoriales detectados por los miembros del panel test (moho, ropa sucia, jabón). El umbral de flavor de esta cetona en muestras acuosas es de 0,65 mg/kg (Kochhar, 1993), concentración superior a la descrita en las muestras de grasa evaluadas, aunque la matriz lipídica puede potenciar el aroma de la 2-heptanona.

La formación de los compuestos volátiles derivados del furano, como el 2-pentilfurano, se ha relacionado con procedimientos que requieren cierto tratamiento con calor, aunque su presencia también se ha detectado en el análisis de jamones

curados (Berdagué y col., 1991a, b; Buscailhon y col., 1993). Diversos derivados del furano se han relacionado con los defectos sensoriales del aceite de soja (Kochhar, 1993). El aroma característico de estos compuestos se describe como a judía, hierba, metálico y mantequilla (Saxby, 1993).

El tejido adiposo de los cerdos enteros se caracteriza por presentar un gran contenido en ácidos grasos insaturados que lo hacen susceptible a las reacciones de oxidación y determinan en gran medida su calidad sensorial. Según cita Bonneau (1998), los problemas asociados a la calidad de la grasa en los cerdos enteros son de mayor importancia a medida que incrementa el porcentaje de magro de las canales. De acuerdo con estos resultados, se ha observado que las concentraciones de los compuestos volátiles que influyen en la calidad de la grasa (aldehidos, ácidos grasos de cadena corta, 2-heptanona, 2-pentil-furano y 1-octen-3-ol) se correlacionaron significativamente con el porcentaje de magro de las canales analizadas.

Por otra parte, las correlaciones altamente significativas descritas entre las concentraciones de los aldehidos y de los ácidos grasos de cadena corta indican posibles vías de degradación paralelas o complementarias para la formación de estos compuestos. Del mismo modo, las correlaciones observadas entre las concentraciones de 1-octen-3-ol, 2-heptanona y 2-pentil-furano mostrarían una relación entre las vías degradativas involucradas.

La presencia de numerosos hidrocarburos alifáticos y aromáticos es una característica común en todas las muestras de grasa analizadas en este estudio. El umbral de olfacción de los hidrocarburos alifáticos es muy elevado y su repercusión en el aroma es escasa o nula (Ruiz y col., 1999). Su posible contribución sería la de matizar el aroma de otros compuestos más significativos.

Los resultados obtenidos en el análisis de las muestras de grasa mediante *Head Space* dinámico han permitido observar la posible contribución de los hidrocarburos aromáticos derivados del benceno en el desarrollo de olores desagradables (estireno) o bien su posible capacidad de dificultar la detección del olor sexual (benceno, benzaldehido, xileno, etilbenceno).

La ruta de formación de los hidrocarburos aromáticos identificados en la grasa está aún por resolver. Según citan López y col. (1992), el benzaldehido podría formarse a partir de la descomposición del ácido linoleico, aunque estudios más recientes

sugieren que podría presentar una vía de síntesis no-lipídica que implicaría la oxidación térmica del aminoácido fenilalanina (Maruri y Larick, 1992). La presencia de tolueno en las muestras de grasa analizadas puede ser debida, en parte, a una contaminación del patrón interno utilizado en este estudio (d8-tolueno). No obstante, este derivado del benceno se ha detectado también en numerosos estudios realizados en jamón curado para la identificación de los compuestos volátiles (Berdagué y García, 1990; Berdagué y col., 1991a, b) y su origen se ha relacionado con la fracción insaponificable de los alimentos y con el catabolismo de la fenilalanina. No obstante estos compuestos también pueden provenir de contaminaciones a partir de los materiales utilizados para el envasado de los alimentos (Tice, 1993).

El estireno identificado en las muestras de grasa analizadas en este estudio puede originarse a partir de los plásticos de poliestireno utilizados para el envasado de la carne y de diferentes tipos de alimentos (Tice, 1993). En determinadas ocasiones (por ejemplo una temperatura excesiva) el estireno puede formarse a partir del polímero y, posteriormente, migrar y acumularse en el propio alimento (Saxby, 1993). El umbral de olfacción del estireno es superior en la grasa (5 mg/kg en la mantequilla) en comparación a las soluciones acuosas (0,022 mg/kg), aunque se ha observado que la migración del monómero es más acusada cuando el poliestireno está en contacto con alimentos grasos. En la bibliografía se han descrito diferentes ejemplos del desarrollo de olores desagradables en galletas, chocolate y mantequilla a causa de la presencia de estireno (Tice, 1993).

La contribución del estireno al aroma global de las muestras de grasa evaluadas fue más representativa cuando las concentraciones de los compuestos relacionados con el olor sexual (androstenona y escatol) eran bajas. La concentración de estireno significativamente superior observada en las muestras que presentaron concentraciones bajas de escatol y androstenona y clasificadas con olor sexual nos permitiría explicar el desarrollo de aromas desagradables en este grupo de muestras detectados por un panel test y descritos como olor sexual.

El origen de los terpenos se ha asociado a la fracción insaponificable procedente de los alimentos vegetales que consume el animal y que, posteriormente, se depositan en el tejido adiposo (Berdagué y col., 1991a; Sabio y col., 1998). Todos estos compuestos presentan aromas característicos que se han descrito como limón en el caso del limoneno y madera o pino en el pineno (Aldrich, 1998). La



contribución al aroma final de estos compuestos no sería muy significativa si se compara a la de otros volátiles que aparecen en cantidades mayores.

El origen de los compuestos organoclorados en los productos alimentarios es debido, en gran medida, a contaminaciones externas por el uso de pesticidas o desinfectantes. Según cita Saxby (1993), el aroma a moho detectado en la carne procedente de pollo contaminado se relacionó con la presencia de hexaclorociclohexano. Del mismo modo, Watson y Patterson (1982) detectaron la presencia de 1,4-diclorobenceno en un lote de carne de cerdo rechazada por los consumidores. El aroma de este compuesto se ha descrito como leña y almendra y su umbral de detección no se ha determinado. Según estos mismos autores, la utilización de determinados productos de limpieza podría ser el origen de la contaminación ocasionada por el 1,4-diclorobenceno, ya que se detectó en concentraciones traza en los materiales utilizados para el envasado de la carne y en la madera utilizada en la construcción de las cuadras.

De acuerdo con estos resultados, la concentración media de 1,4-diclorobenceno significativamente superior descrita en este estudio en muestras de grasa clasificadas con olor sexual según los resultados de un panel test, aunque con concentraciones de escatol y androstenona bajas, permite explicar el desarrollo de defectos sensoriales que pueden ser asociados al olor sexual por los miembros de un panel test. En general, la concentración de 1,4-diclorobenceno en grasa se sitúa a nivel de trazas ( $< 10 \mu\text{g}/\text{kg}$ ) (Watson y Patterson, 1982). La concentración de 1,4-diclorobenceno descrita por estos autores en grasa de cerdos rechazados por los consumidores fue de  $520 \text{ mg}/\text{kg}$ , superior a la concentración media descrita en este estudio ( $502,46 \text{ ng}/\text{g}$ ). Sin embargo, las diferentes metodologías analíticas utilizadas en ambos estudios para la extracción de los compuestos volátiles podrían explicar las diferencias de concentraciones observadas.

Mediante el análisis de componentes principales realizado fue posible observar que los compuestos volátiles identificados inciden sobre el aroma global de distinta forma según las concentraciones de escatol y androstenona de las muestras de grasa evaluadas. En ambos casos, la disposición de los compuestos volátiles sobre los componentes 1 y 2, reflejó la disposición en un grupo de los aldehídos y ácidos grasos de cadena corta, que indicó la correlación altamente significativa existente entre las concentraciones de estos compuestos. Paralelamente, también

se aprecia la correlación entre las concentraciones de 2-heptanona, de estireno y de 1-octen-3-ol y entre los hidrocarburos aromáticos.

El análisis de componentes principales correspondiente a las muestras que presentaron concentraciones bajas de escatol y androstenona (Figura 3.42, A) reflejó que un 70,15% de la variabilidad observada (eje componente 1) era debida a la diferente evaluación sensorial de las muestras de grasa por parte de un panel test (presencia/ausencia de olor sexual), mientras que un 19,95% de las variaciones observadas (eje componente 2) estuvieron determinadas por la naturaleza química de los distintos compuestos volátiles identificados en este estudio. El 1,4-diclorobenceno y los ácidos de cadena corta fueron los compuestos que determinaron básicamente las diferencias en este componente. La disposición sobre el plano de los ejes de las muestras de grasa con concentraciones de escatol y androstenona inferiores a 0,10  $\mu\text{g/g}$  y 0,50  $\mu\text{g/g}$  permitió observar que las muestras clasificadas con olor sexual se asociaron a los compuestos volátiles (1,4-diclorobenceno, 2-heptanona, estireno, ácidos, aldehidos y 1-octen-3-ol) que, como se ha descrito, pueden favorecer el desarrollo en la grasa de aromas desagradables y similares al olor sexual o pueden presentar un efecto sinérgico con el escatol, la androstenona (o con ambos compuestos) y potenciar el desarrollo del defecto sensorial.

El análisis de componentes principales correspondiente a las muestras de grasa con concentraciones elevadas de escatol y androstenona (Figura 3.42, B) mostró que, en esta ocasión, la mayor variabilidad observada (47,90% eje componente 1) era debida a la diferente evaluación sensorial de las muestras de grasa por parte de un panel test (presencia/ausencia de olor sexual). Los aldehidos, los ácidos de cadena corta, el benzaldehido, los hidrocarburos aromáticos, el indol y el escatol fueron, por orden de importancia, los compuestos que presentaron una mayor relevancia en el eje del componente 1. La disposición de los compuestos volátiles en el plano de los ejes permitió observar las correlaciones altamente significativas descritas entre las concentraciones de los ácidos de cadena corta y los aldehidos y entre las concentraciones de los hidrocarburos aromáticos.

La disposición de las muestras de grasa con concentraciones de escatol y androstenona superiores a 0,22  $\mu\text{g/g}$  y 1,0  $\mu\text{g/g}$ , respectivamente, sobre el plano permitió observar que las muestras con olor sexual se asociaron a los compuestos volátiles producto de la oxidación de la grasa (aldehidos y ácidos) y al indol, escatol

y 1-octen-3-ol que, como hemos descrito pueden relacionarse con el desarrollo de aromas desagradables en la grasa que recuerdan al olor sexual. La transferencia de la androstenona a la fracción volátil es relativamente baja y, por tanto, resulta difícil evaluar su impacto en el aroma de las muestras evaluadas mediante esta técnica de *Head Space*.

La relación observada entre las muestras de grasa que no presentaron defecto sensorial con la presencia de hidrocarburos aromáticos (benceno, 1-3-dimetilbenceno, etilbenceno, xileno) y con el benzaldehído podría explicar el motivo por el que los miembros de un panel test entrenado no detectan el olor sexual cuando las concentraciones de escatol y androstenona son elevadas.

#### **4.6. Algunas consideraciones sobre los compuestos identificados en muestras de grasa dorsal de cerdo con concentraciones bajas de escatol y androstenona (BB) mediante las metodologías de purificación desarrolladas**

Los resultados del análisis de componentes principales (Figura 3.52) indicaron que los compuestos identificados en los procedimientos de purificación, mediante la utilización de columnas de sílica (ácido 2-indolcarboxílico) y por cromatografía de filtración de gel (4-fenil-3-buten-2-ona, fenol 2,4-bis-(1,1-dimetiletil, etanona 2-(2-metilpropoxi) y ácido aminocaproico), como posibles candidatos al desarrollo de aromas desagradables se relacionaron con las muestras de grasa procedentes de canales con olor sexual. De acuerdo con estos resultados, aproximadamente un 38% de las variaciones observadas entre las muestras evaluadas (eje componente 1) estuvieron determinadas por la diferente evaluación sensorial de las muestras de grasa por parte de un panel test (presencia/ausencia de olor sexual). La disposición de los compuestos volátiles identificados en el plano de los ejes PC1 y PC2 permitió la observación gráfica de las correlaciones altamente significativas descritas entre las concentraciones del hidroxianisol y del derivado del etanol (etanol 2,2-butoxi-etoxi) y entre las concentraciones de escatol, del derivado del fenol y de la etanona. Compuestos que, junto a la 4-fenil-3-buten-2-ona y al ácido 2-indolcarboxílico, presentaron una mayor relevancia en el eje del componente 1.

Los resultados obtenidos en el análisis sensorial de la 4-fenil-3-buten-2-ona en muestras de grasa, junto a su concentración significativamente superior en muestras de grasa clasificadas con olor sexual según la valoración sensorial de un panel test y con concentraciones bajas de escatol y androstenona (BB), indicarían un posible efecto sinérgico de la 4-fenil-3-buten-2-ona cuando la concentración de androstenona es baja. La presencia de 4-fenil-3-buten-2-ona modificaría el umbral de detección de la androstenona en estas muestras de grasa e incrementaría la sensibilidad de los panelistas frente a la androstenona, favoreciendo la detección de concentraciones inferiores a 0,01 µg/g.

Una posible hipótesis sería suponer que la 4-fenil-3-buten-2-ona presenta la capacidad de unirse de forma inespecífica a los receptores de la androstenona. La comparación entre los modelos de las estructuras tridimensionales de la androstenona (Figura 4.1) y de la 4-fenil-3-buten-2-ona (Figura 4.2) indica cierta similitud entre la disposición espacial de ambos compuestos, principalmente la disposición del átomo de oxígeno (color rojo), aunque la molécula de androstenona presenta un tamaño superior. De este modo, cuando la concentración de androstenona es baja, los receptores sensoriales libres pueden unirse a las moléculas de 4-fenil-3-buten-2-ona y provocar una respuesta sensorial comparable o similar a la obtenida en situaciones de concentraciones elevadas de androstenona.

No obstante, la ausencia de estudios en la bibliografía sobre la naturaleza química de los receptores de androstenona y la forma como se establece la interacción dificulta la obtención de un resultado concluyente en este sentido. Los atributos sensoriales distintos que presentan la androstenona (orina, sudor) y el 5 $\alpha$ -androsteron-16-en-3 $\alpha$ -ol (almizcle) compuestos que difieren únicamente en el oxígeno de la posición C3 (grupo carbonilo en la androstenona y grupo hidroxilo en el androstenol) indican que, probablemente, la unión de estos compuestos con sus receptores tiene lugar a través del átomo de oxígeno.

Por otra parte, la identificación del olor a nafatalina y a ropa sucia, descriptores sensoriales utilizados para describir la presencia de escatol, en las muestras de grasa fortificadas con 4-fenil-3-buten-2-ona y evaluadas sensorialmente permitiría relacionar también la presencia de esta cetona en las muestras con concentraciones bajas de escatol y androstenona con el desarrollo del defecto sensorial.

Los resultados obtenidos para el derivado de la etanona (etanona 2-(2-metilpropoxi)-1,2-difenil) indicarían un modo de actuación similar al descrito para la butenona, aunque debido a que su identificación ha sido sólo tentativa sería necesario la ampliación de los estudios realizados en este sentido.

La presencia de cetonas alifáticas, producto de la autooxidación de los ácidos grasos insaturados, se ha relacionado con el desarrollo de aromas desagradables en los productos alimentarios. La 3-buten-2-ona presenta un umbral de flavor de 0,25 mg/kg y un aroma que se caracteriza como irritante y picante, mientras que la 1-octen-3-ona muestra un umbral de flavor inferior al de muchos aldehidos (0,0001 mg/kg en agua) y su presencia se ha asociado al desarrollo del aroma metálico de los productos oxidados (Kochhar, 1993). Una parte importante de las cetonas identificadas en los productos alimentarios, entre ellas la 2heptanona y la 3 nonanona, son responsables de los aromas de quesos azules y, junto a los ácidos grasos de cadena corta y a las lactonas, contribuyen al aroma de la mantequilla. No obstante, la presencia de estos compuestos en cantidades importantes en los productos cárnicos puede provocar el desarrollo de aromas desagradables y molestos (Berdagué y col., 1991b; Sabio y col., 1998). Por último, los aromas a moho, rancio y hongos detectados en la grasa de la mantequilla se han relacionado con la formación de 1-cis-5-octadien-3-ona, que presenta un umbral de flavor de  $4,4 \times 10^{-4}$  mg/kg en aceite y de  $1,2 \times 10^{-6}$  mg/kg en soluciones acuosas (Kochhar, 1993).

La concentración significativamente superior del derivado fenólico (el fenol 2,4-bis-(1,1-dimetiletil)) identificado por GC-MS en las fracciones obtenidas por cromatografía de filtración de gel de las muestras de grasa clasificadas con olor sexual y concentraciones bajas de escatol y androstenona indicaría su posible participación en el desarrollo del defecto sensorial en estas muestras. La influencia de los compuestos derivados del fenol en el aroma final de un producto alimentario se debe a su volatilidad, concentración elevada y capacidad para quedar absorbidos en el alimento (Saxby, 1993).

De acuerdo con estos resultados, Patterson (1967) describió la posible contribución de los compuestos fenólicos en el olor sexual, principalmente del 4-metilfenol (p-cresol), del guaiacol y del 4etilfenol. Asimismo, la presencia de determinados fenoles (p-cresol, fenol, p-etilfenol) en combinación con elevadas concentraciones

de ácido 3-metilbutanoico se ha relacionado con el desarrollo de defectos sensoriales descritos en el cerdo (Ha y Lindsay, 1991a, b).

El p-cresol presenta un umbral gustativo de 2 µg/l y un umbral de olfacción de 200 µg/l, ambos determinados en soluciones acuosas. El aroma característico descrito para este compuesto es a betún, naftalina, indol o animal (Ha y Lindsay, 1991a; Saxby, 1993). El o-cresol y el m-cresol, con unos umbrales de aproximadamente 70 µg/l en soluciones acuosas, también presentan unos aromas similares al p-cresol, mientras que el 4-etilfenol presenta un umbral relativamente superior y su aroma se describe como a rancio (Ha y Lindsay, 1991a, b).

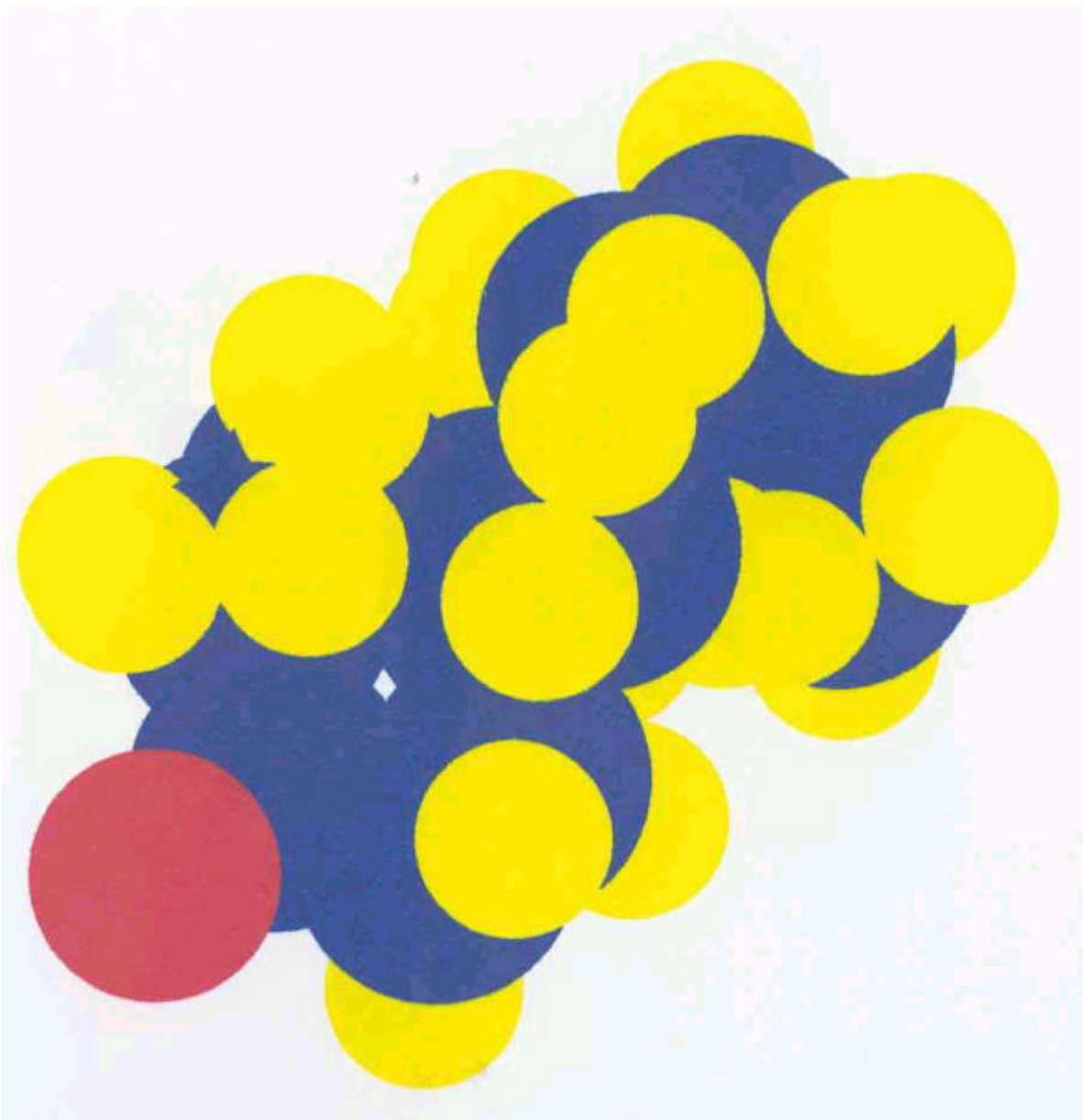


Figura 4.1. Estructura química tridimensional de la 5 $\alpha$ -androst-16-en-3-ona

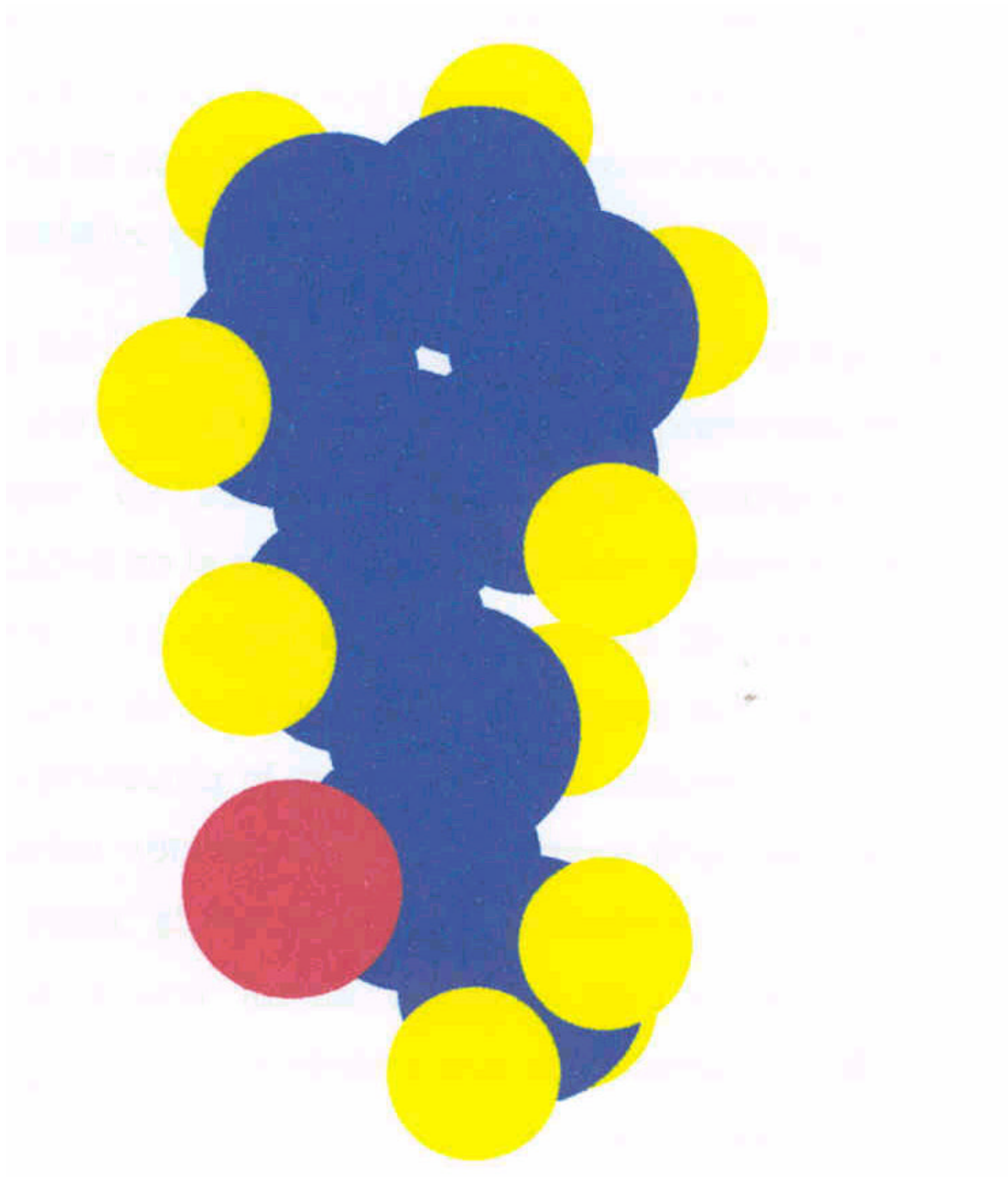


Figura 4.2. Estructura química tridimensional de la 4-fenil-3-buten-2-ona



El p-cresol se ha detectado en patatas fritas procedentes de tubérculos que han permanecido almacenados en espacios húmedos y susceptibles al crecimiento de microorganismos como, por ejemplo, diversas especies de *Clostridium*. El aroma detectado en las patatas se describió como a sucio, cuadra o alcantarilla (Saxby, 1993). Del mismo modo, el 2-metoxifenol (guaiacol) y el correspondiente 2-etoxifenol, compuestos que proceden de la degradación microbiológica de la vanillina, se detectaron en crema de chocolate, generando aromas desagradables que recordaron al descrito como ahumado. El guaiacol también se ha detectado en los tapones de corcho (producto de la degradación de la lignina) utilizados en la industria vinícola y se ha relacionado con los aromas desagradables detectados en los vinos. El umbral de detección del guaiacol determinado en vino blanco es de 20 µg/l y el umbral gustativo en soluciones acuosas es de 50 µg/l (Saxby, 1993).

La alimentación y las fermentaciones microbiológicas en el tracto digestivo son las mayores fuentes para la síntesis de los fenoles presentes en la carne. En un principio, el origen de estos compuestos se relacionó con los procesos tecnológicos aplicados en la elaboración del bacon, debido a la presencia de fenol, p-cresol, 4-etilfenol y 3,5-dimetilfenol en el aroma de este derivado cárnico. No obstante, la detección de los compuestos fenólicos en la grasa de cerdo implica que el ahumado contribuiría al aumento de las concentraciones de determinados fenoles, que influirían notablemente en el aroma final del bacon (Ha y Lindsay, 1991a). Por otra parte, el metabolismo microbiológico del aminoácido aromático tirosina se considera una fuente adicional para la síntesis de los fenoles, principalmente en los cerdos, debido a que su sistema digestivo monogástrico no les permite degradar los terpenos y la lignina, principales fuentes para la síntesis de los fenoles en otras especies como los rumiantes (Ha y Lindsay, 1991a).

La presencia de compuestos de la familia de los anisoles (derivado hidroxianisol) tiene cierto interés, porque estos compuestos se han relacionado, en muchas ocasiones, con el desarrollo de aromas molestos en la carne (rancio y moho). No obstante, la concentración media de este compuesto no presentó diferencias significativas entre las muestras de grasa analizadas en este estudio y clasificadas según la valoración sensorial del panel test (presencia/ausencia de olor sexual). Además, el análisis de componentes principales reflejó que la presencia de este compuesto se relaciona con la ausencia de olor sexual en las muestras de grasa.

En la bibliografía se han descrito diversos estudios que relacionan la presencia de cloroanisoles con el desarrollo de aromas rancios. Por ejemplo, los cloroanisoles se han detectado en carne de pollo almacenada en cajas de madera que contenían gran cantidad de clorofenoles, principalmente triclorofenol y tetraclorofenol, compuestos que podían ser metilados por diversos microorganismos a los correspondientes cloroanisoles. El umbral de olfacción de los cloroanisoles en solución acuosa es muy bajo. Por ejemplo, el 2,3,6-tricloroanisol presenta un umbral de 0,3 pg/l (Saxby, 1993).

Los cloroanisoles, debido a sus características físico-químicas, se depositan básicamente en la grasa. Sin embargo, estos compuestos se han detectado también en alimentos no grasos almacenados durante largos periodos de tiempo en plataformas de carga de madera contaminada por estos productos. Otra fuente de contaminación de cloroanisoles son los embalajes de cartón que se han expuesto a condiciones de almacenamiento húmedas, que favorecen el crecimiento de hongos capaces de metabolizar los clorofenoles a los correspondientes cloroanisoles (Saxby, 1993).

La presencia de cloroanisoles se ha descrito también en los corchos utilizados en las botellas de vino y son responsables de la aparición de los aromas a rancio y moho en esta bebida. Concretamente se ha observado que algunos consumidores presentan la capacidad de detectar una concentración en vino de 10 ng/ $\mu$ l de 2,4,6-tricloroanisol. La presencia de 2,4,6-tricloroanisol se ha descrito recientemente en café, con un umbral de detección de 1-2 ng/l.

Por último, las concentraciones significativamente superiores de los ácidos aminocaproico y 2-indolcarboxílico descritas en las muestras de grasa clasificadas con olor sexual según los resultados de un panel test y con concentraciones de escatol y androstenona bajas confirman los resultados obtenidos en el análisis de componentes principales. La participación de los ácidos de cadena corta en el desarrollo de aromas desagradables se ha discutido anteriormente en el apartado 0. Por otra parte, la presencia del ácido 2-indolcarboxílico en las muestras de grasa analizadas que presentaron concentraciones bajas de escatol indicaría que este compuesto puede formar parte del metabolismo de degradación hepática del escatol (Bæk y col., 1997) y, por tanto, mostrar unas notaciones sensoriales similares.

Los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis doctoral indicarían que el escatol y la androstenona son los principales compuestos relacionados con el desarrollo del olor sexual en las canales de cerdos enteros. No obstante, la presencia de otros compuestos en la grasa, producto del propio metabolismo del animal (los fenoles), de reacciones oxidativas de la grasa (aldehidos, ácidos grasos de cadena corta, cetonas) o simplemente de contaminaciones externas (1,4-diclorobenceno, estireno) pueden contribuir al desarrollo de aromas desagradables que se confundan con el olor sexual o potenciar la influencia del escatol y de la androstenona al defecto sensorial estudiado, como es el caso de la 4-fenil-3-buten-2-ona y de la etanona 2-(2-metilpropoxy)-1,2-difenil.

Asimismo, la baja transferencia a la fase vapor del indol (10%), escatol (5%) y, especialmente, de la androstenona (< 1%) determinada mediante técnicas de *Head Space* estático indica que la concentración de cada uno de los compuestos, así y como, la relación entre ellos en la fase vapor no se corresponde con la concentración real en las muestras de grasa. De acuerdo con estos resultados, la temperatura seleccionada para la preparación y presentación de las muestras a los miembros del panel sensorial para su evaluación influye notablemente en la percepción del olor sexual (Agerhem y Tornberg, 1995). Los porcentajes de androstenona y escatol presentes en la fase vapor varían de acuerdo con los hábitos culinarios característicos de los diferentes países europeos, que determina la respuesta distinta de algunos países a la evaluación del olor sexual; mientras que el porcentaje de consumidores sensibles a la androstenona podría depender, en parte, de la transferencia de este compuesto a la fase vapor. Según estos valores, los resultados del análisis sensorial de las muestras de grasa de cerdo pueden alterarse a consecuencia de la poca volatilidad de los compuestos implicados en el olor sexual y por la presencia en la fase vapor de otros compuestos aromáticos de mayor volatilidad.

Los resultados obtenidos en el análisis de volátiles mediante *Head Space* dinámico realizado en este trabajo y el estudio de las fracciones obtenidas mediante purificación en columnas de sílica y filtración de gel indican que la selección de los miembros de un panel test capaces de discriminar los atributos sensoriales relacionados con el escatol (heces, naftalina, rancio) y la androstenona (orina, sudor, animal), especialmente en presencia de otros compuestos que pueden ofrecer otros estímulos sensoriales, es de gran importancia para la correcta evaluación sensorial

de las muestras de grasa. Por otra parte, la presencia en las muestras de grasa de determinados compuestos químicos con notaciones sensoriales parecidas a las descritas para los compuestos implicados en el olor sexual, principalmente ácidos grasos de cadena corta y aldehidos, puede también influir en la clasificación sensorial de las canales de cerdos enteros.

De acuerdo con estos resultados, en un estudio sensorial realizado con individuos no entrenados se observó que sólo el 25% de los miembros del panel utilizaron los atributos sensoriales de sudor, orina o animal para describir a la androstenona, mientras que, aproximadamente, la misma proporción relacionó la presencia de androstenona con el olor a disolvente (según cita Kilcast, 1993). De forma similar sólo el 28% de los descriptores utilizados para el escatol correspondieron a naftalina o alcanfor de un total de 40 descriptores utilizados para definir la presencia de este compuesto en muestras de grasa.

## **CAPITULO V**

### *Conclusiones*

1. El método desarrollado para la determinación de indol y escatol mediante HPLC-FN permite el análisis rápido y simple de estos compuestos en muestras de grasa dorsal de cerdos enteros sin necesidad de purificar los extractos grasos obtenidos.
2. Las concentraciones medias de escatol e indol fueron significativamente superiores en las muestras de grasa clasificadas previamente, según los equivalentes de escatol determinados mediante el método colorimétrico, con concentraciones elevadas de escatol.
3. Las concentraciones medias de escatol obtenidas mediante HPLC-FN se correlacionaron con los equivalentes de escatol obtenidos mediante el método colorimétrico a concentraciones superiores a 0,20  $\mu\text{g/g}$ . No obstante, cuando los niveles de escatol fueron inferiores a 0,15  $\mu\text{g/g}$  los resultados obtenidos por el método colorimétrico no se correlacionaron con los resultados del método cromatográfico, dado la contribución de otros compuestos en los resultados, en especial del indol.
4. El método desarrollado para la determinación simultánea de la androstenona y de los androstenoles mediante cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas permitió la separación cromatográfica de los dos androstenoles. La obtención de extractos libres de interferencias fue posible gracias a la precipitación en metanol y a temperatura ambiente del material lipídico y a la cromatografía de extracción en fase sólida.
5. Las concentraciones de androstenona y androstenoles fueron significativamente superiores en las muestras de grasa clasificadas previamente, según los resultados del método ELISA, con concentraciones elevadas de androstenona.
6. La concentración de androstenona en el tejido adiposo se correlacionó significativamente con las concentraciones de ambos androstenoles. Esta correlación indica que los androstenoles no contribuirían en el desarrollo del olor sexual en las muestras de grasa con concentraciones bajas de androstenona.
7. La concentración de androstenona determinada mediante GC-MS se correlacionó significativamente con los resultados obtenidos previamente mediante el método ELISA. No obstante, la correlación observada entre las concentraciones de la androstenona y de los androstenoles en muestras de grasa dorsal indica que los

resultados obtenidos mediante ELISA pueden sobrestimar la concentración real de androstenona, debido a la interacción de los androstenoles en los resultados.

8. La disposición del indol, escatol, de la androstenona y de los androstenoles en el análisis de componentes principales es diferente cuando se considera el efecto de los compuestos en global, lo que indicaría que los compuestos indólicos y los esteroides contribuirían de distinta manera al olor sexual.
9. Las concentraciones de escatol e indol determinadas en el músculo se correlacionaron con las concentraciones de estos compuestos en la grasa. No obstante, el músculo presentó unos niveles de indol y escatol significativamente inferiores a los del tejido adiposo. Estas diferencias en las concentraciones de los compuestos relacionados con el olor sexual entre ambos tejidos implican que:
  - la clasificación de las canales de cerdos enteros según la concentración de escatol determinada en grasa puede distorsionar el efecto en músculos con un mayor contenido en magro.
  - la respuesta sensorial de los consumidores dependerá del contenido de grasa infiltrada y grasa de recubrimiento que presenten los músculos
10. La baja transferencia a la fase vapor del indol (10%), escatol (5%) y especialmente de la androstenona (< 1%), determinada mediante técnicas de *Head Space* estático, afecta a los resultados de los análisis sensoriales y, además, influye en la contribución real de cada uno de los compuestos al olor sexual.
11. La presencia de ácidos grasos de cadena corta (hexanoico, heptanoico, nonanoico) y de aldehidos (hexanal, heptanal, nonanal) en las muestras de grasa dorsal de cerdo entero puede, dado a los bajos umbrales de detección de estos compuestos, favorecer el desarrollo de aromas desagradables que sean asociados al olor sexual por los miembros de un panel sensorial.
12. La presencia en muestras de grasa de hidrocarburos aromáticos y de otros compuestos que presentan una notaciones sensoriales intensas puede favorecer la no detección de la androstenona y del escatol por los miembros de un panel entrenado, a pesar de que los compuestos relacionados con el olor sexual se encuentren en concentraciones elevadas.

13. La presencia de 1,4-diclorobenceno y de estireno en las muestras de grasa dorsal con concentraciones bajas de androstenona y escatol y clasificadas previamente con olor sexual por el panel test puede provocar el desarrollo de aromas desagradables que recuerden al olor sexual y que sean valorados incorrectamente por los miembros de un panel sensorial.
14. La identificación de la 4-fenil-3-buten-2-ona en las muestras de grasa dorsal clasificadas con olor sexual y concentraciones bajas de escatol y androstenona, junto a los resultados obtenidos en el estudio sensorial, indican una influencia de este compuesto en el olor sexual. Por una parte la 4-fenil-3-buten-2-ona presentaría una acción sinérgica con la androstenona al potenciar su detección por parte de los panelistas a concentraciones inferiores de 0,01 µg/g. Además, el olor a naftalina que presenta la 4-fenil-3-buten-2-ona puede confundir a los miembros del panel, debido a que es uno de los descriptores sensoriales seleccionados para describir la presencia de escatol en las muestras de grasa evaluadas.
15. La etanona 2-(2-metilpropoxi)-1,2-difenil puede influir en el desarrollo del olor sexual en las muestras de grasa clasificadas con olor sexual y concentraciones bajas de escatol y androstenona, aunque para evaluar su contribución real sería necesario ampliar los estudios realizados.



## **CAPITULO VI**

### *Bibliografia*

- Abouzied, M. M.; Asghar, A.; Pearson, A. M.; Gray, J. Y.; Miller, E. R. y Pestka, J. J. (1990). Monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for C19-delta-16-steroids in serum of boar pigs. *J. Agric. Food Chem.*, **38**: 331
- Agergaard, N. y Laue, A. (1993). Absorption from the gastrointestinal tract and liver turnover of skatole. In: Proceedings of a Meeting of the EAAP Working Group. Production and utilisation of meat from entire male pigs, (Ed. M. Bonneau), INRA, Paris, Les Colloques, n° 60, 107
- Agergaard, N. y Laue, A. (1998). Absorption of skatole to portal vein blood and liver turnover in entire male pigs using an in vivo animal model. In: Skatole and boar taint. Danish Meat Research Institute, Roskilde, Denmark, 77
- Agergaard, N.; Knarreborg, A.; Beck, J.; Laue, A.; Jensen, M. T. y Jensen, B. B. (1995). Absorption of skatole to the portal vein blood following tryptophan infusion to the hind gut. In: Proceedings of a Meeting of the EAAP Working Group. Production and utilisation of meat from entire male pigs. Milton Keynes, United Kingdom, 27-29 September, 1995
- Agergaard, N.; Jensen, B. B.; Laue, A. y Jensen, M. T. (1998). Production and absorption of indole and skatole following tryptophan infusion to the hind gut. In: Skatole and boar taint. Danish Meat Research Institute, Roskilde, Denmark, 97
- Agerhem, H. y Dijksterhuis, G. B. (1995). EU boar taint project: Sensory evaluation by trained panels: Final Proposal. Manuscript.
- Agerhem, H. y Tornberg, E. (1995). A comparison of the off-flavour of meat from entire male pigs cooked to two different internal end-point temperatures. In: Proceedings of a Meeting of the EAAP Working Group. *Production and utilisation of meat from entire male pigs*. Milton Keynes, United Kingdom, 27-29 September, 1995
- Agerhem, H. y Dijksterhuis, G. B. (1997). Sensory evaluation of boar taint by trained panels. In *Proc. 43th International Congress of Meat Science and Technology*, New Zealand, 1997, 1135
- Aishima, T. (1991). Aroma discrimination by pattern recognition analysis of responses from semiconductor gas sensor array. *J. Agric. Food Chem.*, **39**:752
- Aldrich catalogue, (1998). Flavours and fragrances
- Allen, P.; Joseph, R. L. y Lynch, P. B. (1997). Effect of nutrition and management on the incidence of boar taint. In: Proceedings of a Meeting of the EAAP Working Group. *Production and utilisation of meat from entire male pigs*. Stockholm, Sweden, 1-3 October, 1997

- Andersson, H.; Lundström, K.; Rydhmer, L.; Hansson, I.; Forsberg, M. y Andersson, K. (1995a). Effects of spring and autumn light regimens on puberty, boar taint and leanness in entire male pigs. In: Proceedings of a Meeting of the EAAP Working Group. *Production and utilisation of meat from entire male pigs*. Milton Keynes, United Kingdom, 27-29 September, 1995
- Andersson, H.; Schaub, A.; Lundström, K.; Andersson, K. y Hansson, I. (1995b). The effects of feeding system, lysine level and gilt contact on product traits and skatole levels of entire males pigs. In: Proceedings of a Meeting of the EAAP Working Group. *Production and utilisation of meat from entire male pigs*. Milton Keynes, United Kingdom, 27-29 September, 1995
- Andersson, H.; Lundström, K.; Wallgren, M.; Rydhmer, L.; Andersson, K. y Forsberg, M. (1997). Photoperiodic influence on boar taint factors in entire male pigs. In: Proceedings of a Meeting of the EAAP Working Group. *Production and utilisation of meat from entire male pigs*. Stockholm, Sweden, 1-3 October, 1997
- Andresen, Ø. (1974). Development of a radioimmunoassay for  $5\alpha$ -androst-16-en-3-one in pig peripheral plasma. *Acta Endocrinol.*, 76:377
- Andresen, Ø. (1975). A radioimmunoassay for  $5\alpha$ -androst-16-en-3-one in porcine adipose tissue. *Acta Endocrinol.*, 79:619
- Andresen, Ø.; Frøystein, T.; Rødboten, M.; Mortensen, H. P.; Eik-Nes, O. y Lea, P. (1993). Sensory evaluation of boar meat with different levels of androstenone and skatole. In: Proceedings of a Meeting of the EAAP Working Group. *Production and utilisation of meat from entire male pigs*, (Ed. M. Bonneau), INRA, Paris, Les Colloques, nº 60, 69
- Annor-Frempong, I. E.; Nute, G. R.; Wood, J. D. y Whittington, F. W. (1997a). The development of "response classes" for boar taint based on sensory assessment. In: Proceedings of a Meeting of the EAAP Working Group. *Production and utilisation of meat from entire male pigs*. Stockholm, Sweden, 1-3 October, 1997
- Annor-Frempong, I. E.; Nute, G. R.; Whittington, F. W. y Wood, J. D. (1997b). The problem of taint in pork: I. Detection thresholds and odour profiles of Androstenone and Skatole in a model system. *Meat Sci.*, 46:45
- Annor-Frempong, I. E.; Nute, G. R.; Whittington, F. W. y Wood, J. D. (1997c). The problem of taint in pork: II. The influence of skatole, androstenone and indole presented individually and in combination in a model lipid base, on odour perception. *Meat Sci.*, 47:49

- Annor-Frempong, I. E.; Nute, G. R.; Whittington, F. W. y Wood, J. D. (1997d). The problem of taint in pork: III. Odour profile of pork fat and the interrelationships between androstenone, skatole and indole concentrations. *Meat Sci.*, 47:63
- Annor-Frempong, I. E.; Nute, G. R.; Wood, J. D.; Whittington, F. W. y West, A. (1998). The measurement of the responses to different odour intensities of 'Boar Taint' using a sensory panel and a electronic nose. *Meat Sci.*, 50:139
- Anónimo, (1996). El consumo de carne y productos cárnicos en España. Informe Anual Eurocarne 96: 49
- Anónimo, (1998). El sector de mataderos y la producción de carne durante 1997. *Eurocarne*, 64:17
- Arnau, J.; Díaz, I.; García-Regueiro, J. A.; Hortós, M. y Casademont, G. (1986). Influence of boar taint in organoleptic characteristics of Spanish cured ham. In: Proc. 32th European Meeting of Meat Research Workers, Vol. II, 311
- Arnau, J.; García-Regueiro, J. A.; Díaz, I.; Hortós, M.; Diestre, A. y Monfort, J. M. (1987). La problemática de los machos enteros en el jamón curado. En *Jamón Curado. Aspectos Técnicos* (Eds. J. Arnau, M. Hugas y J. M. Monfort). IRTA, Girona. pp 119
- Arpa, I.; Diestre, A. y Monfort, J. M. (1988). Incidencia del olor sexual en canales porcinas de machos sin castrar según panel de olfacción y su relación con la androstenona. *Investigación Agraria Producción y Sanidad Animal*, 3: 9
- Awoniyi, C. A.; Chandrashekar, V.; Arthur, R. D.; Schanbacher, B. D.; Amador, A. G. y Falvo, R. E. (1988). Pituitary and Leydig cell function in boars actively immunized against gonadotrophin-releasing hormone. *J. Reprod. Fert.*, 84: 295
- Babol, J.; Squires, J. E. y Gullett, E. A. (1995). Factors affecting the level of boar taint as determined by trained and consumer sensory panels. In: *Proceedings of a Meeting of the EAAP Working Group. Production and utilisation of meat from entire male pigs*. Milton Keynes, United Kingdom, 27-29 September, 1995
- Babol, J.; Squires, J. E. y Gullett, E. A. (1996). Investigation of factors responsible for the development of boar taint. *Food Research Intern.*, 28: 573
- Babol, J.; Squires, J. E. y Lundström, K. (1997a). Involvement of cytochrome P450IIE1 in hepatic metabolism and clearance of skatole. In: *Proceedings of a Meeting of the EAAP Working Group. Production and utilisation of meat from entire male pigs*. Stockholm, Sweden, 1-3 October, 1997
- Babol, J.; Squires, J. E. y Lundström, K. (1997b). Relationship between oxidation and conjugation metabolism of skatole in pig liver and levels of skatole in fat. In,

- Proceedings of a Meeting of the EAAP Working Group. Production and utilisation of meat from entire male pigs. Stockholm, Sweden, 1-3 October, 1997
- Babol, J.; Squires, J. E. y Lundström, K. (1997c). Relationship between metabolism of androstenone and skatole. In: Proceedings of a Meeting of the EAAP Working Group. Production and utilisation of meat from entire male pigs. Stockholm, Sweden, 1-3 October, 1997
- Bæk, C. Æ.; Hansen-Møller, J.; Friis, C. y Hansen, S. H. (1995). Identification and quantification of selected metabolites of skatole-possibilities for metabolic profiling of pigs. In: Proceedings of a Meeting of the EAAP Working Group. *Production and utilisation of meat from entire male pigs*. Milton Keynes, United Kingdom, 27-29 September, 1995
- Bæk, C. Æ.; Hansen-Møller, J.; Friis, C. y Hansen, S. H. (1997). Identification of selected metabolites of skatole in plasma and urine from pigs. *J. Agric. Food Chem.*, **45**: 2332
- Beeri, K. E. y Sink J. D. (1971). Isolation and identification of  $3\alpha$ -hydroxy- $5\alpha$ -androst-16-ene- and  $5\alpha$ -androst-16-en-3-one from porcine tissue. *J. Endocrin.*, **51**: 223
- Beeri, K. E.; Sink J. D.; Stuart P. y Ziegler, J. H. (1971). Characterisation of the swine sex odour (SSO) components in boar fat volatiles. *J. Food Sci.*, **36**: 1086
- Bejerholm, C. y Barton-Gade, P. (1993). The relationship between skatole/androstenone and odour/flavour of meat from entire male pigs. In: Proceedings of a Meeting of the EAAP Working Group. Production and utilisation of meat from entire male pigs, (Ed. M. Bonneau), INRA, Paris, Les Colloques, n° 60, 75
- Bendall, J. R. (1973). The structure and function of muscle, Vol. 2 (Ed. G. H. Bourne). Academic Press, Nueva York. pp 243
- Bendall, J. R. y Swatland, H. J. (1988). A review of the relationships of pH with physical aspects of pork quality. *Meat Sci.*, **24**: 85
- Berdagué, J. L. y García, C. (1990). Volatile constituents of dry ham. *Viandes et Produits Carnés*, **11**: 319
- Berdagué, J. L. y Talou, T. (1993). Exemples d'application aux produits carnés des senseurs de gaz à semi-conducteurs. *Sci. Aliments*, **13**: 141
- Berdagué, J. L.; Bonnaud, N.; Rousset, S. y Touraille, C. (1991a). Volatile compounds of dry-cured ham: identification and sensory characterisation by sniffing. In: Proc. 37th International Congress of Meat Science and Technology, Kulmbach, Germany, 1-6 September, 1991, Vol. 3: 1135

- Berdagué, J. L.; Denoyer, C.; Le Queré, J. L. y Semon, E. (1991b). Volatile compounds of dry-cured ham. *J. Agric. Food Chem.*, **39**: 1257
- Berdagué, J. L.; Bonnaud, N.; Rousset, S. y Touraille, C. (1993a). Influence of pig crossbreed on the composition volatile compound content and flavour of dry cured-ham. *Meat Sci.*, **34**: 119
- Berdagué, J. L.; Viallon, C.; Bonneau, M. y Le Denmat, M. (1993b). Indirect evaluation of boar taint with gas chromatographic mass spectrometric measurement of head space volatiles. In: Proceedings of a Meeting of the EAAP Working Group. *Production and utilisation of meat from entire male pigs*, (Ed. M. Bonneau), INRA, Paris, France, Les Colloques n° 60, 49
- Berdagué, J. L.; Talou, T. y Bonneau, M. (1995). Estimation of androstenone content in backfat samples, using semiconductor gas sensors or pyrolysis-mass-spectrometry. In: Proceedings of a Meeting of the EAAP Working Group. *Production and utilisation of meat from entire male pigs*. Milton Keynes, United Kingdom, 27-29 September, 1995
- Berdagué, J. L.; Rabot, C. y Bonneau, M. (1996). Rapid classification of back fat samples selected according to their androstenone content by pyrolysis-mass spectrometry. *Sci. Aliments*, **16**: 425
- Berg, H.; Agerhem, H.; Von Seth, G.; Tornberg, E. y Andersen, O. (1993). The relationship between skatole and androstenone content and sensory off-odour in entire male pigs. In: Proceedings of a Meeting of the EAAP Working Group. *Production and utilisation of meat from entire male pigs*, (Ed. M. Bonneau), INRA, Paris, Les Colloques, n° 60, 55
- Bicknell, D. C. y Gower, D. B. (1971). The separation of C19-16-unsaturated steroids from C21 and other C19-steroids by two-dimensional thin-layer chromatography. *J. Chromatogr.*, **61**: 358
- Bicknell, D. C. y Gower, D. B. (1976). The development and application of a radioimmunoassay for 5 $\alpha$ -andros-16-en-3-one in plasma. *J. Steroid Biochem.*, **7**: 451
- Bidanel, J. P.; Milan, D.; Chevalet, C.; Woloszyn, N.; Caritez, J. C.; Gruand, J.; Le Roy, P.; Bonneau, M.; Renard, C.; Vaiman, M.; Gellin, J. y Ollivier, L. (1997). Chromosome 7 mapping of a quantitative trait locus for fat androstenone level in Meishan X Large White F2 entire male pigs. In: Proceedings of a Meeting of the EAAP Working Group. *Production and utilisation of meat from entire male pigs*. Stockholm, Sweden, 1-3 October, 1997

- Boghossian V.; Hennesey D.; Mosbey J.; Salvatore L.; Sali L.; Jackson P.; Reynolds J. y Mawson R. (1994). Immunocastration- A strategy to produce "taint free" high quality pork from intact boars. In: Proc. 40th International Congress of Meat Science and Technology, Texas, 1994
- Bonneau, M. (1982). Compounds responsible for boar taint, with special emphasis on androstenone: a review. *Livest. Prod. Sci.*, 9: 687
- Bonneau, M. (1997). EU research programme on boar taint: overall presentation of the programme, aim, participants, general organisation. In: Proceedings of a Meeting of the EAAP working group, Production and utilisation of meat from entire male pigs. Stockholm, Sweden, 1-3 october, 1997
- Bonneau, M. (1998). Use of entire males for pig meat in the European Union. *Meat Sci.*, 49: S257
- Bonneau, M. y Desmoulin, B. (1981). Influence de l'excès de tryptophane et des conditions d'élevage sur la fréquence des odeurs sexuelles des jeunes porcs mâles entiers: relation avec le developement de l'appareil génital. *J. Rech. Porcine en France*, 28: 329
- Bonneau, M. y Terqui, M. (1983). A note on the metabolism of 5 $\alpha$ -androst-16-en-3-one in the young boar in vivo. *Reprod. Nutr. Dévelop.*, 23: 899
- Bonneau, M. y Cook, G. (1997). Characteristics of the samples selected for sensory evaluations and consumer surveys. In: Proceedings of a Meeting of the EAAP working group. Production and utilisation of meat from entire male pigs. Stockholm, Sweden, 1-3 October, 1997
- Bonneau, M.; Desmoulin, B.; Frouin, A. y Bidard, J. P. (1980). Conséquences des processus technologiques de transformation des viandes de porc mâle sur la teneur en androsténone des graisses. *Ann. Technol. Agric.*, 29: 69
- Bonneau, M.; Meusy-Dessolle, M.; Léglise, P. C. y Claus, R. (1982a). Relationships between fat and plasma androstenone and plasma testosterone in fatty and lean young boars following castration. *Acta Endocr.*, 101: 129
- Bonneau, M.; Meusy-Dessolle, M.; Léglise, P. C. y Claus, R. (1982b). Relationships between fat and plasma androstenone and plasma testosterone in fatty and lean young boars during growth and after HCG stimulation. *Acta Endocr.*, 101: 119
- Bonneau, M. ; Le Denmat, M. ; Vaudelet, J.C. ; Veloso Nunes, J.R.; Mortensen, A.B. y Mortensen, H.P. (1992a). Contributions of fat androstenone and skatole to boar taint: I. Sensory attributes of fat and pork meat. *Livest. Prod. Sci.*, 32: 63

- Bonneau, M. ; Le Denmat, M. ; Vaudelet, J.C. ; Veloso Nunes, J.R.; Mortensen, A.B. y Mortensen, H.P. (1992b). Contributions of fat androstenone and skatole to boar taint: II. Eating quality of cooked hams. *Livest. Prod. Sci.*, 32: 81
- Bonneau, M.; Meadus, W. J. y Squires, E. J. (1992c). Effects of exogenous porcine somatotropin on performance testicular steroid production and fat levels of boar taint related compounds in young boars. *Can. J. Anim. Sci.*, 72: 537
- Bonneau, M.; Le Denmat, M. ; Mortensen, A.B. y Mortensen, H.P. (1993a). Relationships between fat androstenone and skatole levels and the organoleptic assessment of pork and cooked ham. In: *Proceedings of a Meeting of the EAAP Working Group. Production and utilisation of meat from entire male pigs*, (Ed. M. Bonneau), INRA, Paris, Les Colloques, n° 60, 81
- Bonneau, M.; Dufour, R.; Chouvet, C.; Roulet, C.; Meadus, W. y Squires, E. L. (1993b). The effects of immunization against luteinizing hormone-releasing hormone on performance, sexual development and levels of boar taint-related compounds in intact male pigs. In: *Proceedings of a Meeting of the EAAP Working Group. Production and utilisation of meat from entire male pigs*, (Ed. M. Bonneau), INRA, Paris, Les Colloques, n° 60, 167
- Bonneau, M.; Meadus, W. J. y Squires, E. J. (1993c). Fat androstenone and skatole levels and in vitro testicular steroid production in pigs treated with porcine somatotropin. In: *Proceedings of a Meeting of the EAAP Working Group. Production and utilisation of meat from entire male pigs*, (Ed. M. Bonneau), INRA, Paris, Les Colloques, n° 60, 185
- Bonneau, M.; Dufour, R.; Chouvet, C.; Roulet, C.; Meadus, W. y Squires, E. J. (1994). The effects of immunization against Luteinizing Hormone-Releasing Hormone on performance, sexual development and levels of boar taint related compounds in intact male pigs. *J. Anim. Sci.*, 72: 14
- Booth, W. D. (1975). Changes with age in the occurrence of C19 steroids in the testis and submaxillary gland of the boar. *J. Reprod. Fert.*, 42: 459
- Booth, W. D.; Williamson, E. D. y Patterson, R. L. S. (1986). 16-androstene steroids in the submaxillary salivary gland of the boar in relation to measures of boar taint in carcasses. *Anim. Prod.*, 42: 145
- Bourrounet, B.; Talou, T. y Gaset, A. (1995). Application of a multi-gas-sensor device in the meat industry for boar-taint detection. *Sensors and Actuators B*, 26: 250
- Boutten, B.; Guizard, C.; Mamas, S. y Venduvre, J. L. (1994). Dosage immunoenzymatique de l' androsténone. *Viandes Prod. Carnés*, 15: 185



- Boutten, B.; Juul, L.; Petitjean, G.; Demeulemester, C.; Hausseguy, E. y Vendeuvre, J. L. (1995). Dosage colorimétrique du scatole. *Viandes Prod. Carnés*, 16: 9
- Bradley, B. J. y Carlson, J. R. (1974). A gas-liquid chromatographic procedure for the determination of indole and 3-methylindole in bovine plasma. *Analyt. Biochem.*, 59: 214
- Brennan, J. J.; Shand, P. J.; Fenton, M.; Nicholls, L. L. y Aherne, F. X. (1986). Androstenone, androstenol and odour intensity in backfat of 100-130 Kg boars and gilts. *Can. J. Anim. Sci.*, 66: 615
- Brooks, R. I. y Pearson, A. M. (1986). Steroid hormone pathways in the pig, with special emphasis on boar odour: a review. *J. Anim. Sci.*, 62: 632
- Brooks, R. I. y Pearson, A. M. (1989). Odour thresholds of the C19- $\Delta$ -16-steroids responsible for boar odour in pork. *Meat Sci.*, 24: 11
- Brooks, R. I.; Pearson, A. M.; Hogberg, M. G.; Pestka, J. J. y Gray, J. I. (1986). An immunological approach for prevention of boar odour in pork. *J. Anim. Sci.*, 62: 1279
- Buscaillon, S.; Berdagué, J. L. y Monin, G. (1993). Time-related changes in volatile compounds of lean tissue during processing of French dry-cured ham. *J. Sci. Food Agric.*, 63: 69
- Christie, W. W. (1989). The analysis of fatty acids. In: *Gas Chromatography and Lipids, A Practical Guide*. The Oily Press, Ayr, pp 64-84
- Claus, R. (1974). Dosage radioimmunologique du 5 $\alpha$ -androst-16-en-3-one, steroid responsable de l'odeur de verrat dans le tissu adipeux du porcs. *C. R. Séances Acad. Sci. Ser.*, 278: 299
- Claus, R.; Hoffmann B. y Karg, H. (1971). Determination of 5 $\alpha$ -androst-16-en-3-one, a boar taint steroid in pigs with reference to relationship to testosterone. *J. Anim. Sci.*, 33: 1293
- Claus, R.; Mahler, G. y Münster, E. (1988). Determination of the boar taint steroid 5 $\alpha$ -androst-16-en-3-one in adipose tissue of pigs with a rapid microtitre plate enzyme-immunoassay (MTE). *Archiv. Für Lebensmittelhygiene*, 39: 87
- Claus, R.; Dehnhard, M.; Herzog, A.; Bernal-Barragan, H. y Giménez, T. (1993). Parallel measurements of indole and skatole (3-methylindole) in faeces and blood plasma of pigs by HPLC. *Livest. Prod. Sci.*, 34: 115

- Claus, R.; Weiler, U. y Herzog, A. (1994). Physiological aspects of androstenone and skatole formation in the boar- a review with experimental data. *Meat Sci.*, 38: 289
- Claus, R.; Herbert, E. y Dehnhard, M. (1997a). Comparative determination of the boar taint steroid androstenone in pig adipose tissue by a rapid enzyme immunoassay and a HPLC-method. *Archiv. Für Lebensmittelhygiene*, 48: 25
- Claus, R.; Weiler, U.; Cook, G.; Walstra, P. y Claudi-Magnussen, C. (1997b). EU research programme on boar taint: accuracy of the rapid measurements of androstenone and skatole comparatively to laboratory methods. In: *Proceedings of a Meeting of the EAAP working group. Production and utilisation of meat from entire male pigs. Stockholm, Sweden, 1-3 October, 1997*
- Cliplaf, R. L.; Grinwich, D. L. y Castell, A. G. (1984). Consumer acceptance of fresh pork products from littermate boars and barrows. *Can. J. Anim. Sci.*, 64: 21
- Cliplaf, R. L.; Grinwich, D. L. y McKay, R. M. (1985). Levels of  $5\alpha$ -androst-16-en-3-one ( $5\alpha$ -androstenone) in serum and fat of intact and castrated mature boars. *Can. J. Anim. Sci.*, 65: 247
- Craig, H. B. y Pearson, A. M. (1959). Some preliminary studies on sex odour in pork. *J. Anim. Sci.*, 18: 1557
- Craig, H. B.; Pearson, A. M. y Webb N. B. (1962). Fractionation of the components responsible for sex odour/flavour in pork. *J. Anim. Sci.*, 27: 29
- Cramer, D. A. (1983). Chemical compounds implicated in lamb flavour. *Food Technol.*, 5: 249
- DeBrabander, H. F. y Verbeke, R. (1986). Quantitative determination of androstenone in pig adipose tissue. *J. Chromatogr.*, 363: 293
- DeBrabander, H. F.; Verbeke, R.; Dirinck, P. y Cateels, M. (1985). Boar taint in Belgian Landrace pigs in relation to the androstene content, In: *Proc. 31th International Congress of Meat Science and Technology*, 778
- DeBrabander, H. F.; Verbeke, R.; De Wilde, R. O.; Storm, P. K. y Van Der Linden, M. (1986). Comparison of two analytical methods of androstenone determination in backfat of pigs, treated with anabolic steroids. In: *Proc. 32th International Congress of Meat Science and Technology*, Ghent, Belgium, 1988
- DeVries, A. W. y Walstra, P. (1993). Aroma profiles. In: *Proceedings of a Meeting of the EAAP Working Group. Production and utilisation of meat from entire male pigs*, (Ed. M. Bonneau), INRA, Paris, Les Colloques, nº 60, 93

- Dehnhard, M.; Bernal-Barragan, H. y Claus, R. (1991). Rapid and accurate high-performance liquid chromatographic method for the determination of 3-methylindole (skatole) in faeces of various species. *J. Chromatogr.*, 566: 101
- Dehnhard, M.; Claus, R.; Hillenbrand, M. y Herzog, A. (1993). High-performance liquid chromatographic method for the determination of 3-methylindole (skatole) and indole in adipose tissue of pigs. *J. Chromatogr.*, 616: 205
- Desmoulin, B. (1983). Sex effects on the deposition and quality of fat in lean pigs. *J. Rech. Porcine en France*, 25: 389
- Desmoulin, B.; Bonneau, M.; Frouin, A. y Bidard, J. P. (1981). Acceptabilité par le consommateur des viandes de porc mâle entier selon leur emploi en boucherie ou en charcuterie: importance de la teneur en androsténone. In: *Proc. 27th European Meeting of Meat Research Workers*, Viena, 1981
- Desmoulin, B.; Donnart, J. y Bonneau, M. (1982a). Composition des graisses et appréciation sensorielle des viandes de porcs de divers types sexuels. In: *Proc. 28th European Meeting of Meat Research Workers*, Madrid, 1982
- Desmoulin, B.; Bonneau, M.; Frouin, A. y Bidard, J. P. (1982b). Consumer testing of pork and processed meat from boars: the influence of fat androstenone level. *Livest. Prod. Sci.*, **9**: 707
- Díaz, I. (1993). Modificaciones de la composición lipídica durante procesos tecnológicos del jamón curado. *Tesis doctoral*. Universidad Autónoma de Barcelona
- Diestre, A. (1984). La investigación aplicada en la calidad de la canal y de la carne en el porcino. *Med. Vet.*, **1**: 69
- Diestre, A. (1991). Producción de carne de cerdo utilizando machos enteros. *Cárnica* 2000, Julio-Agosto:57
- Diestre, A.; Calsina, D.; Casademont, G. y Monfort, J. M. (1982). A note on the incidence of boar taint in the carcasses of non castrated pigs slaughtered in Catalunya. In: *Proc. 28th International Congress of Meat Science and Technology*, Madrid, Spain, 1982
- Diestre, A.; Oliver, M. A.; Gispert, M.; Arpa, I. y Arnau, J. (1990). Consumer responses to fresh meat and meat products from barrows and boars with different levels of boar taint. *Anim. Prod.*, **50**: 519
- Dijksterhuis, G.; Walstra, P.; Agerhem, H.; Cook, G.; Font, M.; Claudi-Magnussen, C.; Siret, F.; Beague, M. P.; Oliver, M. A. y Fisher, K. (1997). Preliminary analysis on the results of the sensory evaluations by tes panels. . In: *Proceedings of a*

- Meeting of the EAAP working group. *Production and utilisation of meat from entire male pigs*. Stockholm, Sweden, 1-3 October, 1997
- Dufour, J. J.; Bonneau, M.; Chouvet, C.; Roulet, C. y Squires, E. J. (1993). Androstenona and skatole levels in fat and in vitro testicular steroid production in LHRH-immunized pigs. In: Proceedings of a Meeting of the EAAP Working Group. Production and utilisation of meat from entire male pigs, (Ed. M. Bonneau), INRA, Paris, Les Colloques, nº 60, 197
- Dufour, J. J.; Reid, J. y Sirard, M. A. (1995). The effects of long lasting GnRH agonist on utilisation of meat from entire male pigs. In, Proceedings of a Meeting of the EAAP Working Group. Production and utilisation of meat from entire male pigs. Milton Keynes, United Kingdom, 27-29 September, 1995
- Eikelenboom, G. y Minkema, D. (1974). Prediction of pale, soft and exudative muscle with a non lethal test for the halothane induced porcine malignant hiperthermia syndrome. *Neth. J. Vet. Sci.*, 99: 421
- Ender, K.; Kuhn, G. y Nürnberg, K. (1995). Reducing skatole by the use of De-Odorase. In: Proceedings of a Meeting of the EAAP Working Group. Production and utilisation of meat from entire male pigs. Milton Keynes, United Kingdom, 27-29 September, 1995
- Edwards, S. M.; Squires, E. J.; VanDerMark, P. K. y Steggles, A. W. (1997). Involvement of cytochrome B5 in androstenone biosynthesis. In: Proceedings of a Meeting of the EAAP working group. Production and utilisation of meat from entire male pigs. Stockholm, Sweden, 1-3 October, 1997
- Falvo, R. E.; Chandrashekar, V.; Arthur, R. D.; Kuenstler, A. R.; Hasson, T.; Awoniyi, C. y Schanbacher, B. D. (1986). Effect of active immunization against LHRH or LH in boars: reproductive consequences and performance traits. *J. Anim. Sci.*, 63: 986
- Folch, J.; Lees, M. y Sloan-Stanley, G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. *J. Biol. Chem.*, 226: 497
- Fortin, A.; Friend, D. W. y Sarkar, N. K. (1983). A note on the carcass composition of Yorkshire boars and barrows. *Can. J. Anim. Sci.*, 63: 711
- Fouler, V. R.; Mc William, T. y Artken, R. (1981). Voluntary feed intake of boars, castrates and gilts given diets of different nutrient density. *Anim. Prod.*, 32: 357
- Friis, C. (1993). Distribution, metabolic fate and elimination of skatole in the pig. In: Proceedings of a Meeting of the EAAP Working Group. Production and

- utilisation of meat from entire male pigs, (Ed. M. Bonneau), INRA, Paris, Les Colloques, nº 60, 113
- Friis, C. (1995). Is boar taint related to sex differences or polymorphism of skatole metabolism? In: Proceedings of a Meeting of the EAAP Working Group. Production and utilisation of meat from entire male pigs. Milton Keynes, United Kingdom, 27-29 September, 1995
- García, C.; Berdagué, J. L.; Antequera, T.; López-Bote, C.; Córdoba, J. J. y Ventanas, J. (1991). Volatile components of dry cured Iberian ham. *Food Technol.*, 23: 251
- García-Regueiro, J. A. y Díaz, I. (1985). Determination of 5 $\alpha$ -Androst-16-en-3-one in back fat of pigs by CGC and ECD. *J. High Res. Chromatogr.*, 10580: 698
- García-Regueiro, J. A. y Díaz, I. (1989). Evaluation of the contribution of skatole, indole and androstenone to boar taint in backfat of pigs by HPLC and capillary gas chromatography (CGC). *Meat Sci.*, 25: 307
- García-Regueiro, J. A. y Rius, M. A. (1998). Rapid determination of skatole and indole in pig back fat by normal-phase liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, 809: 246
- García-Regueiro, J. A.; Hortós, M.; Arnau, J. y Monfort, J. M. (1986a). Determination of skatole and indole in back fat of pigs by HPLC. *J. High Res. Chromatogr.*, 10619: 362
- García-Regueiro, J. A.; Diaz, I.; Hortós, M. y Arnau, J. (1986b). Analysis of skatole and 5 $\alpha$ -Androst-16-en-3-ona in meat products by HPLC and HRGC. In: Proc. 32th European Meeting of Meat Research Workers, Ghent, Belgium, 1986
- García-Regueiro, J. A.; Rius, M. A. y Diaz, I. (1995). Evaluation of boar taint compounds in vapour phase by Head Space techniques coupled to capillary GC-MS. In: Proceedings of a Meeting of the EAAP Working Group. Production and utilisation of meat from entire male pigs. Milton Keynes, United Kingdom, 27-29 September, 1995
- Gardner, J. W. y Bartlett, P. N. (1994). A brief history of electronic noses. *Sensors and Actuators B*, 46-47: 211
- Gibis, M.; Hilmes, C. y Fisher, A. (1998). Off-flavour in pork caused by skatole. *Fleischwirtschaft*, 78: 727
- Giersing, M.; Lundström, K. y Andersson, A. (1997). Social effects on boar taint. In: Proceedings of a Meeting of the EAAP working group. Production and utilisation of meat from entire male pigs. Stockholm, Sweden, 1-3 October, 1997

- Godt, J.; Kristensen, K.; Poulsen, C. S.; Juhl, H. J. y Bech, A. C. (1996). A consumer study of Danish entire male pigs. *Fleischwirtschaft*, 76: 518
- Gorbatov, V. M. y Lyaskovskaya, N. Y. (1980). Review of the flavour-contributing volatiles and water-soluble non-volatiles in pork meat and derived products. *Meat Sci.*, 4: 209
- Gower, D. B. (1969). Biosynthesis of the androgens and other C19 steroids. *Acta endocrin.*, 5: 170
- Gower, D. B. y Katkov, T. (1972). Studies on the biosynthesis and excretion of C19- $\Delta$ 16-steroids in the boar. *J. Steroid Biochem.*, 3: 45
- Grandin, T. (1988). Stress et manipulation des animaux. *Rec. Méd. Vét.*, 164: 813
- Greaser, M. L. (1986). Conversion of muscle to meat. En *Muscle as Food* (Ed. P. J. Bechtel). Academic Press, Londres. pp 37
- Grinwich, D. L.; Cliplef, R. L. y McKay, R. M. (1988). Measurement of 16-androstenes (5 $\alpha$ -androst-16-en-3-one/5 $\alpha$ -androst-16-en-3 $\alpha$ -ol) in saliva of mature boars of two breeds following castration. *Can. J. Anim. Sci.*, 68: 969
- Ha, J. K. y Lindsay, R. C. (1991a). Volatile alkylphenols and thiophenol in species-related characterising flavours of red meats. *J. Food Sci.*, 56: 1197
- Ha, J. K. y Lindsay, R. C. (1991b). Volatile branched-chain fatty acids and phenolic compounds in aged Italian Cheese flavors. *J. Food Sci.*, 59: 2312
- Hansen, L. L. (1998). Influence of environmental factors and antibiotics on skatole in pigs. In: *Skatole an Boar Taint*. Danish Meat Research Institute, Roskilde, Denmark, 137
- Hansen, L. L.; Larsen, A. E.; Jensen, B. B.; Hansen-Møller, J. y Barton-Gade, P. (1993). Influence of stocking rate and temperature on faeces deposition in the pen and its consequences on skatole concentration in subcutaneous fat. In: *Proceedings of a Meeting of the EAAP Working Group. Production and utilisation of meat from entire male pigs*, (Ed. M. Bonneau), INRA, Paris, Les Colloques, nº 60, 151
- Hansen, L. L.; Larsen, A. E.; Jensen, B. B.; Hansen-Møller, J. y Barton-Gade, P. (1994). Influence of stocking rate and faeces deposition in the pen at different temperatures on skatole concentration (boar taint) in subcutaneous fat. *Anim. Prod.*, 59: 99
- Hansen, L. L.; Larsen, A. E.; Jensen, B. B. y Hansen-Møller, J. (1995a). Short time effect of an antibiotic feed additive and heavy fouling with faeces plus urine on

- boar taint in male pigs with high and low basic skatole levels in blood. In: Proceedings of a Meeting of the EAAP Working Group. Production and utilisation of meat from entire male pigs. Milton Keynes, United Kingdom, 27-29 September, 1995
- Hansen, L. L.; Larsen, A. E.; Laue, A.; Jensen, M. T.; Agergaard, N.; Jensen, B. B.; Bæk, C. Æ.; Hansen-Møller, J.; Friis, C. y Hansen, S. H. (1995b). Skatole pattern during the growth period from 50 to 120 K in female and entire male pigs with a possible different genetic skatole status. In: Proceedings of a Meeting of the EAAP Working Group. Production and utilisation of meat from entire male pigs. Milton Keynes, United Kingdom, 27-29 September, 1995
- Hansen, L. L.; Lundström, K.; Laue, A.; Jensen, M. T.; Agergaard, N.; Bæk, C. Æ. y Hansen-Møller, J. (1997). Skatole and androstenone pattern during the growth period from 90 to 120 Kg in pigs with high or low skatole levels in back fat at slaughter. In: Proceedings of a Meeting of the EAAP Working Group. Production and utilisation of meat from entire male pigs. Stockholm, Sweden, 1-3 October, 1997
- Hansen-Møller, J. (1992). Determination of indolic compounds in pig back fat by solid-phase extraction and gradient high-performance liquid chromatography with special emphasis on the boar taint compound skatole. *J. Chromatogr.*, 624: 479
- Hansen-Møller, J. (1993). HPLC methods for determination of indole, skatole and related indoles in pig backfat. In: Proceedings of a Meeting of the EAAP Working Group. Production and utilisation of meat from entire male pigs, (Ed. M. Bonneau), INRA, Paris, France, Les Colloques, n° 60, 35
- Hansen-Møller, J. (1994). Rapid high-performance liquid chromatographic method for simultaneous determination of androstenone, skatole and indole in back fat from pigs. *J. Chromatogr.*, 624: 479
- Hansen-Møller, J. y Andersen, J. R. (1992). Alternative methods for assessment of boar taint. In: Proc. 38th International Congress of Meat Science and Technology, Clermont-Ferrand, France, 1992
- Hansen-Møller, J. y Andersen, J. R. (1994). Boar taint-analytical alternatives. *Fleischwirtschaft*, 74: 963
- Hansen-Møller, J. y Godt, J. (1995). A consumer study of Danish entire male pigs. In: Proceedings of a Meeting of the EAAP Working Group. Production and utilisation of meat from entire male pigs. Milton Keynes, United Kingdom, 27-29 September, 1995

- Hanson, K. E.; Lundström, K.; Fjelkner-Modig, S. y Pearson, J. (1980). The importance of androstenone and skatole for boar taint. *Swed. J. Agric. Res.*, 10: 167
- Haugen, J. E. y Kvaal, K. (1998). Electronic nose and artificial neural network. *Meat Sci.*, 49: S273
- Hawe, M.; Moss, B. W.; Walker, N. y Porter, M. (1989). Distribution of skatole and indole compounds in pigs: influence of dietary factors. In *Proceedings of the 35th International Congress of Meat Science and Technology, Copenhagen, Denmark, 1989, Vol. 3: 1036*
- Hennessy, D.; Salvatore, L. y Sali, L. (1995a). Incidence of and nature of boar taint in Australian pigs. In: *Proceedings of a Meeting of the EAAP Working Group. Production and utilisation of meat from entire male pigs. Milton Keynes, United Kingdom, 27-29 September, 1995*
- Hennessy, D. P.; McColl, M.; Mosbey, M.; Salvatore, L.; Sali, L. y Waldron, D. (1995b). The control of boar taint by manipulation of LHRH. In: *Proceedings of a Meeting of the EAAP Working Group. Production and utilisation of meat from entire male pigs. Milton Keynes, United Kingdom, 27-29 September, 1995*
- Hennessy, D. P.; Colantoni, C.; Dunshea, F. R.; Howard, K.; Jackson, P.; Long, K.; Lopaticki, S.; Sali, L.; Simons, J. y Walker, J. (1997). Elimination of boar taint: a commercial boar taint vaccine for male pigs. In: *Proceedings of a Meeting of the EAAP Working Group, Production and utilisation of meat from entire male pigs. Stockholm, Sweden, 1-3 October, 1997*
- Jarmoluk, L.; Martin, A. H. y Freeden, H. T. (1970). Detection of boar taint (sex odour) in pork. *Can. J. Anim. Sci.*, 50: 750
- Jensen, B. B. y Jensen, M. T. (1993). In vitro measurements of microbial production of skatole in the digestive tract of pigs. In: *Proceedings of a Meeting of the EAAP Working Group. Production and utilisation of meat from entire male pigs, (Ed. M. Bonneau), INRA, Paris, France, Les Colloques n° 60, 99*
- Jensen, M. T. y Jensen, B. B. (1994). Gas chromatographic determination of indole and 3-methylindole (skatole) in bacterial culture media, intestinal contents and faeces. *J. Chromatogr.*, 655: 275
- Jensen, B. B. y Jensen, M. T. (1995). Microbial production of skatole in the hind gut of pigs fed different diets and its relation to skatole disposition in backfat. In: *Proceedings of a Meeting of the EAAP Working Group. Production and utilisation of meat from entire male pigs. Milton Keynes, United Kingdom, 27-29 September, 1995*



- Jensen, B. B. y Jensen, M. T. (1998). Microbial production of skatole in the digestive tract of entire male pigs. In: Skatole and boar taint. Danish Meat Research Institute, Roskilde, Denmark, 41
- Jensen, M. T.; Cox, R. P. y Jensen, B. B. (1995a). 3-Methylindole (skatole) and indole production by mixed populations of pig faecal bacteria. *Appl. Environ. Microbio.*, 61: 3180
- Jensen, M. T.; Cox, R. P. y Jensen, B. B. (1995b). Microbial production of skatole in the hind gut of pigs given different diets and its relation to skatole deposition in backfat. *Anim. Sci.*, 61: 293
- Jensen, M. T.; Jensen, B. B.; Laue, A.; Agergaard, N. y Bibby, B. M. (1997). Effect of various carbohydrate sources on the production of skatole in the hind gut of pigs and skatole concentration in blood plasma. In: Proceedings of a Meeting of the EAAP Working Group. Production and utilisation of meat from entire male pigs. Stockholm, Sweden, 1-3 October, 1997
- Jeon, I. J. (1993). Undesirable flavours in dairy products. En Food taints and off-flavours. (Ed. M. J. Saxby) pp 122
- Kaufmann, G.; Ritter, F. y Schubert, K. (1976). Quantitative determination of the boar taint substance 5 $\alpha$ -androst-16-en-3-one in fat. *J. Steroid Biochem.*, 7: 593
- Kilcast, D. (1993). Sensory evaluation of taints and off-flavours. En Food taints and off-flavours. (Ed. M. J. Saxby) pp 1
- Kjeldsen, N. (1993). Practical experience with production and slaughter of entire male pigs. In: Proceedings of a Meeting of the EAAP Working Group. Production and utilisation of meat from entire male pigs, (Ed. M. Bonneau), INRA, Paris, Les Colloques, n<sup>o</sup> 60, 137
- Knapp, D. R. (1979). Handbook of analytical derivatisation reactions. John Wiley & Sons Inc., USA
- Knudson, B. K.; Hogberg, M G.; Merkel, R. A.; Allen, R. E. y Magee, W. T. (1985). Developmental comparisons of boars and barrows: I. Growth rate, carcass and muscle characteristics. *J. Anim. Sci.*, 61: 789
- Kochhar, S. P. (1993). Oxidative pathways to the formation of off-flavours. In: Food taints and off-flavours. Edited by M. J. Saxby, 1993, 150
- Lambooy, E.; Garssen, G. J.; Walstra, P.; Mateman, G. y Merkus, G. S. M. (1985). Transport of pigs by car for two days; some aspects of watering and loading density. *Livest. Prod. Sci.*, 13: 289

- Larson, E.; Mejbörn, H.; Maribo, H. y Bejerholm, C. (1993). The production of entire male pigs in Denmark. The causes of boar taint and sensory assessment. In: Proc. 39th International Congress of Meat Science and Technology, Calgary, Canada, 1993
- LeDenmat, M.; Hervo, N.; Vaudelet, J. C. y Bonneau, M. (1993). The effect of slaughter weight on fat androstenone and skatole levels and on the assessment of boar taint in entire male pigs. In: Proceedings of a Meeting of the EAAP Working Group. Production and utilisation of meat from entire male pigs, (Ed. M. Bonneau), INRA, Paris, Les Colloques, nº 60, 167
- LeRoy, P.; Fouilloux, M. N.; Bonneau, M.; Gruand, J.; Renard, C. y Sellier, P. (1997). Evidence for single major genes influencing fat androstenone level and development of bulbo-urethral glands in young boars. In: Proceedings of a Meeting of the EAAP Working Group. Production and utilisation of meat from entire male pigs. Stockholm, Sweden, 1-3 October, 1997
- Lin, R. S.; Orcutt, M. W.; Patterson, J. A. y Judge, M. D. (1991). Serum skatole detection using gas chromatography and high performance liquid chromatography. *Meat Sci.*, 30: 33
- Lin, R. S.; Orcutt, M. W.; Allrich, R. D. y Judge, M. D. (1992). Effect of dietary crude protein content on skatole concentration in boar serum. *Meat Sci.*, 31: 473
- López, M. O.; de la Hoz, L.; Cambero, M. I.; Gallardo, E.; Reglero, G. y Ordóñez, J. A. (1992). Volatile compounds of dry hams from Iberian pigs. *Meat Sci.*, 31: 267
- López-Bote, C. y Ventanas, J. (1988). The reduction of boar taint in male pigs by neonatal testosterone administration. *Meat Sci.*, 22: 163
- López-Bote, C.; Sancho, G.; Reuvers, T.; García-Regueiro, J. A.; Antequera, T. y Ventanas, J. (1990). Consequences of androgen administration on indol and skatole concentration in back fat in male pigs. Proc. 36 th International Congress of Meat Science and Technology, La Habana, Cuba, 1990
- Louveau, I.; Bonneau, M. y Gower, D. B. (1991). Biosynthesis of 16-androstene steroids and testosterone by porcine testis tissue in vitro: effect of age and relationships with fat 5 $\alpha$ -androstenone levels in vivo. *Acta Endocrinol.*, 125: 526
- Lundström, K. y Malmfors, B. (1985). Recent research on the use of boars for meat production-report from the EAAP working group meeting in Denmark, 1984. *Livest. Prod. Sci.*, 13: 303
- Lundström, K. y Malmfors, B. (1993). Genetic influence on skatole deposition in entire male pigs. In: Proceedings of a Meeting of the EAAP Working Group.

- Production and utilisation of meat from entire male pigs, (Ed. M. Bonneau), INRA, Paris, Les Colloques, n° 60, 159
- Lundström, K.; Malmfors, B.; Petersson, H.; Stern, S.; Mortensen, A. B. y Sørensen, S. E. (1984). Boar taint and bitter taste as affected by androstenone and skatole. In: Proc. 30 th European Meeting of Meat Research Workers, Bristol
- Lundström, K.; Malmfors, B.; Malmfors, G.; Stern, S.; Petersson, H.; Mortensen, A. B. y Sørensen, S. E. (1988). Skatole, androstenone and taint in boars fed two different diets. *Livest. Prod. Sci.*, 18: 55
- Lundström, K.; Malmfors, B.; Stern, S.; Rydhmer, L.; Elliasson-Selling, L.; Mortensen, A. B. y Mortensen, H. P. (1994). Skatole levels in pigs selected for high lean tissue growth rate on different dietary protein levels. *Livest. Prod. Sci.*, 38: 125
- McCauley, I.; Hennessy, D. P.; Boghossian, V.; Sali, L.; Salvatore, L.; Reynolds, J. y Mawson, R. (1997). Effect of methods of cooking and processing pork on the perception of boar taint. In: Proceedings of a Meeting of the EAAP Working Group. Production and utilisation of meat from entire male pigs. Stockholm, Sweden, 1-3 October, 1997
- Mågård, M. Å.; Berg, H. E. B.; Tagesson, V.; Järemo, L. G.; Karlsson, L. H.; Mathiasson, J. E.; Bonneau, M. y Hansen-Møller, J. (1995). Determination of androstenone in pig fat using supercritical fluid extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, 43: 114
- Malmfors, B. y Lundström, K. (1983). Consumer reactions to boar meat- a review. *Livest. Prod. Sci.*, 10: 187
- Manns, J. G. y Robbins, S. R. (1997). Prevention of boar taint with a recombinant based GnRH vaccine. In: Proceedings of a Meeting of the EAAP Working Group. Production and utilisation of meat from entire male pigs. Stockholm, Sweden, 1-3 October, 1997
- Manns, J. G.; Redmond, M. A.; Van Kessel, A. y Laarveld, B. (1995). Development of vaccines which interrupt the hypothalamic-pituitary axis for immunocastration of male swine. In: Proceedings of a Meeting of the EAAP Working Group. Production and utilisation of meat from entire male pigs. Milton Keynes, United Kingdom, 27-29 September, 1995
- Maruri, J. L. y Larick, D. K. (1992). Volatile concentration and flavour of beef as influenced by diet. *J. Food Sci.*, 57: 1275
- Matthews, K. R.; Homer, D. B. y Leskanich, C. O. (1997a). The effect of sex on the eating quality of British sausages prepared from individual entire male and

- females pigs. In: Proceedings of a Meeting of the EAAP Working Group. Production and utilisation of meat from entire male pigs. Stockholm, Sweden, 1-3 October, 1997
- Matthews, K.; Punter, P.; Cook, G.; Font, M.; Agerhem, H.; Claudi-Magnussen, C.; Siret, F.; Beague, M. P.; Gispert, M. y Fisher, K. (1997b). Preliminary analyses on the results on the consumer surveys. In: Proceedings of a Meeting of the EAAP Working Group. Production and utilisation of meat from entire male pigs. Stockholm, Sweden, 1-3 October, 1997
- Meadus, W. J. y Squires, E. J. (1993). Regulation of the biosynthesis of the androst-16-ene steroids. In: Proceedings of a Meeting of the EAAP Working Group. Production and utilisation of meat from entire male pigs, (Ed. M. Bonneau), INRA, Paris, Les Colloques, nº 60, 125
- Mikami, M.; Yamada, Y.; Wakahara, Y. y Miura, H. (1991). Effects of electrical stimulation on the sarcoplasmatic proteins, peptide and amino acid contents of beef. *Anim. Sci., Technol.*, (Jpn) 62: 519
- Morrison, W. R. y Smith, L. M. (1964). Preparation of fatty acid methyl esters and dimethyl acetates from lipids with boron fluoride-methanol. *J. Lipid Res.*, 4: 600
- Mortensen A. B. y Sørensen S. E. (1984). Relationship between boar taint and skatole determined with a new analysis method. In: Proc. 30th European Meeting Research Workers, Bristol, England, 1984, 394
- Mortensen A. B.; Bejerholm, C. y Pedersen, J. K. (1986). Consumer test of meat from entire males in relation to skatole in back fat. In: Proc. 32th European Meeting Research Workers, Ghent, Belgium, 1986, 23
- Moss, B. W.; Hawe, S. M. y Walker, N. (1993). Sensory thresholds for skatole and indole. In: Proceedings of a Meeting of the EAAP Working Group. Production and utilisation of meat from entire male pigs, (Ed. M. Bonneau), INRA, Paris, Les Colloques, nº 60, 63
- Moss, B. W.; Hawe, S. M. y Walker, N. (1995). Analytical considerations of methods for measuring skatole. In: Proceedings of a Meeting of the EAAP Working Group. Production and utilisation of meat from entire male pigs. Milton Keynes, United Kingdom, 27-29 September, 1995
- Moss, B. W.; Beattie, V. E. y Weatherup, N. (1997). Effect of increasing slaughter weight on meat quality and boar taint. In: Proceedings of a Meeting of the EAAP working group. Production and utilisation of meat from entire male pigs. Stockholm, Sweden, 1-3 October, 1997

- Murray, A. C.; Jones, S. D. M. y Sather, A. P. (1989). The effect of preslaughter feed restriction and genotype for stress susceptibility on pork lean quality and composition. *Can. J. Anim. Sci.*, 69: 83
- Newton, K. G. y Gill, C. D. (1981). The microbiology of DFD fresh meats: A review. *Meat Sci.*, 5: 223
- Norheim, G. y Rygge, J. (1978). Gas chromatographic determination of indole and 3-methylindole in ovine plasma and rumen fluid using a nitrogen-phosphorus selective detector. *J. Chromatogr.*, 154: 291
- Nute, G. R.; Whittington, F. M.; Warriss, P. D. y Wood, J. D. (1995). Sensory analysis of boar taint. Influence of skatole on abnormal odour and flavour ratings. In: *Proceedings of a Meeting of the EAAP Working Group. Production and utilisation of meat from entire male pigs. Milton Keynes, United Kingdom, 27-29 September, 1995*
- Oliver, M. A.; Gispert, M. y Diestre, A. (1988). Estudio del pH1 de los músculos Longissimus dorsi y Semimembranosus en canales porcinas comerciales. *Medicina Veterinaria*, 5: 45
- Oliver, M. A.; Gispert, M. y Diestre, A. (1993). The effects of breed and halothane sensitivity on pig meat. *Meat Sci.*, 35: 105
- Oonk, H. B.; Turkstra, J. A.; Lankhof, H.; Schaaper, W. M. M.; Puijk, W. C.; Dijkstra, G.; Wensing, C. J. G. y Meloen, R. H. (1993). Experience with an anti-GnRH vaccine in male piglets. In: *Proceedings of a Meeting of the EAAP Working Group. Production and utilisation of meat from entire male pigs*, (Ed. M. Bonneau), INRA, Paris, Les Colloques, nº 60, 207
- Oonk, H. B.; Turkstra, J. A.; Schaaper, W. M. M. y Meloen, R. H. (1995). Further experience with anti-GnRH vaccines in males pigs. In: *Proceedings of a Meeting of the EAAP Working Group. Production and utilisation of meat from entire male pigs. Milton Keynes, United Kingdom, 27-29 September, 1995*
- ØVerland, M.; Berg, J. y Matre, T. (1995). The effect of feed and feeding regime on skatole and androstenone levels and on sensory attributes of entire male and female pigs. In: *Proceedings of a Meeting of the EAAP Working Group. Production and utilisation of meat from entire male pigs. Milton Keynes, United Kingdom, 27-29 September, 1995*
- Patterson, R. L. S. (1967). A possible contribution of phenolic components to boar odour. *J. Sci. Food Agric.*, 18: 8

- Patterson, R. L. S. (1968a).  $5\alpha$ -androst-16-ene-3-one: compound responsible for taint in boar fat. *J. Sci. Food Agric.*, 19: 31
- Patterson, R. L. S. (1968b). Identification of  $3\alpha$ -hydroxy- $5\alpha$ -androst-16-ene as the musk odour component of boar submaxillary salivary gland and its relationship to the sex odour taint in pork meat. *J. Sci. Food Agric.*, 19: 434
- Patterson, R. L. S. y Lightfoot, A. L. (1984). Effect of sex grouping during growth on  $5\alpha$ -androst-16-ene development in boars at three commercial slaughter weights. *Meat Sci.*, 10: 253
- Patterson, R. L. S.; Buxton, E. y Partridge, I. (1987). Immunization against  $5\alpha$ -androst-16-ene in boars using androst-16-ene-KLH and GnRH-KLH as immunogens. In: *Proc. 33th International Congress of Meat Science and Technology*, Vol. 1: 34
- Patterson, R. L. S.; Elks, P. K.; Lowe, D. B. y Kempster, A. J. (1990). The effects of different factors on the levels of androst-16-ene and skatole in pig fat. *Anim. Prod.*, 50: 551
- Peleran, J. C. y Bories, G. F. (1985). Gas chromatographic determination and mass spectrometric confirmation of traces of indole and 3-methylindole (skatole) in pig back fat. *J. Chromatogr.*, 324: 469
- Porter, M. G.; Hawe, S. M. y Walker, N. (1989). Method for the determination of indole and skatole in pig fat. *J. Sci. Food Agric.*, 49: 203
- Pozo, G. M. (1997). El consumo de carnes y productos cárnicos en España. *Eurocarne*, 70: 17
- Raab, S.; Weiler, U.; Dehnhard, M. y Claus, R. (1995). Endocrine and nutritional effects on gut tissue turnover. In: *Proceedings of a Meeting of the EAAP Working Group. Production and utilisation of meat from entire male pigs*. Milton Keynes, United Kingdom, 27-29 September, 1995
- Raab, S.; Claus, R. y Leiser, R. (1997). Effects of dietary factors on gut cell turnover and its consequences for skatole concentrations in peripheral blood. In: *Proceedings of a Meeting of the EAAP Working Group. Production and utilisation of meat from entire male pigs*. Stockholm, Sweden, 1-3 October, 1997
- Rius, M. A. (1997). Evaluación mediante técnicas cromatográficas de los compuestos relacionados con el desarrollo del olor sexual en grasa de cerdo. *Trabajo Experimental*, Girona, Setiembre, 1997
- Rius, M. A. y García-Reguerio, J. A. (1998). Analysis of androst-16-ene in pig back fat by solid-phase extraction and GC-MS. In: *Proc. 44th International Congress of*

- Meat Science and Technology, Barcelona, 30 Agosto-4 Setiembre, 1998, Vol. 2: 584
- Rius, M. A. y García-Reguerio, J. A. (1999). Skatole and indole concentrations in loin and fat samples of pigs. *Meat Sci.*, Submitted
- Rius, M. A.; Hortós, M. y García-Regueiro, J. A. (1999). Simultaneous determination of androstenone and androstenols in backfat by GC-MS. *J. Chromatogr.*, in press
- Rousset-Akrim, S.; Young, O. A. y Berdagué, J. L. (1997). Diet and growth effects in panel assessment of sheepmeat odour and flavour. *Meat Sci.*, 45: 169
- Ruiz, J.; Ventanas, J.; Cava, R.; Andrés, A. y García, C. (1999). Volatile compounds of dry-cured Iberian ham as affected by the length of the curing process. *Meat Sci.*, 52: 19
- Sabio, E.; Vidal-Aragón, M. C.; Bernalte, M. J. y Gata, J. L. (1998). Volatile compounds present in six types of dry-cured ham from south European countries. *Food Chem.*, 61: 493
- SAS Institute Inc. (1988). *SAS/STAT user's guide: release 6.03 edition*. Statistical Analysis Systems Institute Inc., Cary, NC
- Saxby, M. J. (1993). A survey of chemicals causing taints and off-flavours in foods. En: *Food taints and off-flavours*. (Edited by M. J. Saxby). pp 35
- Schilt, R.; Haasnoot, W.; Van Bennekom, E. O.; Hooijerink, H.; Weseman, J. M.; Korbee, H. J. y Traag, W. A. (1989). Determination of the boar taint steroid 5 $\alpha$ -androst-16-en-3-one in adipose tissue of pigs by size exclusion chromatography (SEC) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). *Archiv für Lebensmittelhyg.*, 40: 51
- Schneider, F.; Ender, K.; Kuhn, G. y Falkenberg, H. (1995). Boar taint and meat quality after GnRH-analogue treatment. In: *Proceedings of a Meeting of the EAAP Working Group. Production and utilisation of meat from entire male pigs*. Milton Keynes, United Kingdom, 27-29 September, 1995
- Sellier, P.; Bonneau, M. y Gruand, J. (1993). Preliminary results of a selection experiment based on an index associating fat androstenone level and bulbo-urethral gland size. In: *Proceedings of a Meeting of the EAAP Working Group. Production and utilisation of meat from entire male pigs*, (Ed. M. Bonneau), INRA, Paris, Les Colloques, nº 60, 173
- Sellier, P.; Le Roy, P.; Fouilloux, M. N.; Gruand, J. y Bonneau, M. (1997). Results of a selection experiment based on an index associating fat androstenone level and bulbo-urethral gland size of young boars. In: *Proceedings of a Meeting of the*

- EAAP Working Group. Production and utilisation of meat from entire male pigs. Stockholm, Sweden, 1-3 October, 1997
- Siret, F.; Béague, M. P.; Argy, S.; Bouten, B. y Vendeuvre, J. L. (1995). Influence of androstenone concentration in fat used in a pate de Campagne on boar taint intensity and on consumer preferences. In: Proceedings of a Meeting of the EAAP Working Group. Production and utilisation of meat from entire male pigs. Milton Keynes, United Kingdom, 27-29 September, 1995
- Siret, F.; Béague, M. P.; Fisher, K. y Chevillon, P. (1997a). Consumer acceptability and characterisation of the cooking odour of pork with different androstenone and skatole contents: comparison of two cooking procedures. In: Proceedings of a Meeting of the EAAP Working Group. Production and utilisation of meat from entire male pigs. Stockholm, Sweden, 1-3 October, 1997
- Siret, F.; Béague, M. P.; Fisher, K. y Chevillon, P. (1997b). Consumer acceptability and characterisation of the cooking odour of lardons produced from pork with different androstenone and skatole contents. In: Proceedings of a Meeting of the EAAP Working Group. Production and utilisation of meat from entire male pigs. Stockholm, Sweden, 1-3 October, 1997
- Sjövall, J. y Axelson, M. (1979). General and selective isolation procedures for GC-MS analysis of steroids in tissues and body fluids. *J. Steroid Biochem.*, 11: 129
- Smulders, F. J. M.; Romme, A. M. C. S.; Woolthuis, C. H. J.; De Kruijf, J. M.; Eikelenboom, G. y Corstiaensen, G. P. (1983). Prestunning treatment during lairage and pork quality. En *Stunning of Animals for Slaughter* (Ed. G. Eikelenboom). Martinus Nijhoff Publ., La Haya. pp 90
- Squires, E. J. (1990). Studies on the suitability of a colourimetric test for androst-16-ene steroids in the submaxillary gland and fat of pigs as a simple chemical test for boar taint. *Can. J. Anim. Sci.*, 70: 1029
- Squires, E. J. y Lou, Y. (1995). Levels of boar taint in pure-bred entire male pigs in Canada. In: Proceedings of a Meeting of the EAAP Working Group. Production and utilisation of meat from entire male pigs. Milton Keynes, United Kingdom, 27-29 September, 1995
- Squires, E. J. y Lundström, K. (1997). Relationship between cytochrome P450IIE1 in liver and levels of skatole and its metabolites in intact male pigs. *J. Anim. Sci.*, 75: 2506



- Squires, E. J.; Gullett, E. A.; Fisher, K. R. S. y Partlow, G. D. (1991). Comparison of androst-16-ene steroid levels determined by a colorimetric assay with boar taint estimated by a trained sensory pane. *J. Anim. Sci.*, 69: 1092
- Squires, E. J.; Deng, H. y Wu, L. (1993a). Colorimetric method for the determination of androst-16-ene steroids in carcasses. In: *Proceedings of a Meeting of the EAAP Working Group. Production and utilisation of meat from entire male pigs*, (Ed. M. Bonneau), INRA, Paris, France, Les Colloques n° 60, 41
- Squires, E. J.; Adeola, O.; Young, L. G. y Hacker, R. R. (1993b). The role of growth hormones,  $\beta$ -adrenergic agents and intact males in pork production: a review. *Can. J. Anim. Sci.*, 73: 1
- Stamer, S.; Nürnberg, K.; Kanitz, W. y Kalm, E. (1993). Assessment of boar taint by androstenone and skatole levels and organoleptic tests. In: *Proceedings of a Meeting of the EAAP Working Group. Production and utilisation of meat from entire male pigs*, (Ed. M. Bonneau), INRA, Paris, Les Colloques, n° 60, 87
- Stern, S.; Johansson, K.; Rydhmer, L. y Andersson, K. (1992). Pigs performance tested for lean tissue growth rate in a selection experiment on low and high protein diets. *Anim. Sci.*, 104: 67
- Tarrant, P. V. (1988). Le stress du transport chez les animaux de ferme. *Rec. Méd. Vét.*, 64: 823
- Thompson, R. H. y Pearson, A. M. (1977). Quantitative determination of  $5\alpha$ -androst-16-en-3-one by gas chromatography-mass spectrometry and its relationship to sex odour. *J. Agric. Food Chem.*, 25: 1241
- Thompson, R. H.; Pearson, A. M. y Banks, K. A. (1972). Identification of some C19- $\Delta$ 16-steroids contributing to sex odour in pork. *J. Agric. Food Chem.*, 20: 185
- Tice, P. (1993). Packaging material as a source of taints. In: *Food taints and off-flavours*. Edited by M. J. Saxby, 1993, 202
- Timón, M. L. (1999). Estudio de la contribución de la grasa subcutánea e intermuscular a la calidad sensorial de jamones de cerdos ibéricos con distintos tipos de alimentación. Tesis doctoral. Universidad de Extremadura
- Tuomola, R. H.; Harpio, R.; Koivikko, P.; Mikola, H. y Lövgren, T. (1996a). Determination of  $5\alpha$ -androst-16-en-3-one concentrations in boar serum and fat using time-resolved fluoroimmunoassay. In: *Proc. 42th International Congress of Meat Science and Technology*, Denmark, 1996, 288

- Tuomola, M.; Vahva, M. y Kallio, H. (1996b). High-Performance liquid chromatography determination of skatole and indole levels in pig serum, subcutaneous fat, and submaxillary salivary glands. *J. Agric. Food Chem.*, 44: 1265
- Tuomola, R. H.; Vahva, M. y Kallio, H. (1996c). Determination of skatole and indole levels in pig serum, subcutaneous fat and submaxillary salivary glands. In: *Proc. 42th International Congress of Meat Science and Technology*, Denmark, 1996, 290
- Tuomola, M.; Hakala, M. y Manninen, P. (1997). Supercritical fluid chromatography-mass spectrometry (SFC-MS) of androstenone without sample purification or derivatisation. In: *Proceedings of a Meeting of the EAAP Working Group. Production and utilisation of meat from entire male pigs*. Stockholm, Sweden, 1-3 October, 1997
- Tuomola, M.; Hakala, M. y Manninen, P. (1998). Determination of androstenone in pig fat using packed column supercritical fluid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr.*, 719: 25
- van Dijk, R. (1995). First steps in developing and instrument for measuring boar taint. In: *Proceedings of a Meeting of the EAAP Working Group. Production and utilisation of meat from entire male pigs*. Milton Keynes, United Kingdom, 27-29 September, 1995
- van der Lende, T.; Kruijt, L. y Tieman, M. (1993). Can passive immunization with anti-GnRH monoclonal antibodies, injected a few weeks before slaughter, prevent boar taint? In: *Proceedings of a Meeting of the EAAP Working Group. Production and utilisation of meat from entire male pigs*, (Ed. M. Bonneau), INRA, Paris, Les Colloques, n° 60, 201
- Ventanas, J.; Córdoba, J. J.; Antequera, T.; García, C.; López-Bote, C. y Asensio, M. A. (1992). Hydrolysis and Maillard reaction during the repening of Iberian ham. *J. Food Sci.*, 57: 813
- Verga, G. R. y Poy, F. (1976). Gas chromatography of nitrogen- and phosphorus-containing compounds. A new, high-sensitivity, variable selectivity detector. *J. Chromatogr.*, 116: 17
- Viallon, C.; Berdagué, J. L.; Denoyer, C.; Tran, N.; Bonneau, M. y LeDenmat, M. (1992). Analysis of volatile components from the backfat of pig and relations with androstenone content. In: *Proc. 38th International Congress of Meat Science and Technology*, Clermont-Ferrand, France, 1992

- Vold, E. (1970). Report No. 238. Institute of Animal Genetics and Breeding, N.L.H., Vollabekk, Norway.
- Von Seth, G.; Petersson, H. y Tornberg, E. (1995). The influence of slaughter-weight, feeding intensity and lysine level on the content of androstenone and skatole on the sensory properties of meat from entire males. In: Proceedings of a Meeting of the EAAP Working Group. Production and utilisation of meat from entire male pigs. Milton Keynes, United Kingdom, 25-29 September, 1995
- Walstra, P. (1974). Fattening young boars: quantification of negative and positive aspects. *Livest. Prod. Sci.*, 1: 187
- Walstra, P. y Maarse, H. (1970). IVO-Rapport No. 2. Researchgroep Vlees en Vleeswaren TNO, Zeist.
- Walstra, P. y Garssen, G. J. (1995). Influence of quality of the pigs and season on androstenone level. In: Proceedings of a Meeting of the EAAP Working Group. Production and utilisation of meat from entire male pigs. Milton Keynes, United Kingdom, 25-29 September, 1995
- Walstra, P.; Engel, B. y Mateman, G. (1986). The androstenone-skatole dilemma as applied in a consumer test. Proc. 32 th European Meeting Meat Research Workers, Ghent, 1986
- Walstra, P.; Moerman, P. C. y Storm, P. K. (1995). The ELISA method for detection of androstenone. In: Proceedings of a Meeting of the EAAP Working Group. Production and utilisation of meat from entire male pigs. Milton Keynes, United Kingdom, 25-29 September, 1995
- Walstra, P.; Claudi-Magnussen, C.; Cook, G y Chevillon, P. (1997). Androstenone and skatole levels according to seasons and countries. In: Proceedings of a Meeting of the EAAP Working Group. Production and utilisation of meat from entire male pigs. Stockholm, Sweden, 1-3 October, 1997
- Walstra, P.; Claudi-Magnussen, C.; Chevillon, P.; von Seth, G.; Diestre, A.; Matthews, K.; Homer, D. y Bonneau, M. (1999). An international study on the importance of androstene and skatole for boar taint: Levels of androstenone and skatole according to country and season. *Livest. Prod. Sci.*, in press
- Warris, P. D. (1987). The effect of time and conditions of transport and lairage on pig meat quality. En *Evaluation and Control of Meat Quality in Pigs* (Eds. P. V. Tarrant, G. Eikelenboom y G. Monin). Martinus Nijhoff Publishers, La Haya. pp 24

- Watson, A. y Patterson, R. L. S. (1982). Tainting of pork meat by 1,4-dichlorobenzene. *J. Sci. Food Agric.*, 33: 103
- Webb, A. J. y Simpson, S. P. (1986). Performance of British Landrace pigs selected for high and low incidence of halothane sensitivity. *Anim. Prod.*, 43: 493
- Weiler, U.; Fisher, K.; Kemmer, H.; Dobrowolski, A. y Claus, R. (1997). Influence of androstenone sensitivity on consumer reactions to boar meat. In: *Proceedings of a Meeting of the EAAP Working Group. Production and utilisation of meat from entire male pigs. Stockholm, Sweden, 1-3 October, 1997*
- Whittington, F. M.; Nute, G. R.; Warriss, P. D. y Wood, J. D. (1995). Skatole and androstenone measurements in the U. K. In: *Proceedings of a Meeting of the EAAP Working Group. Production and utilisation of meat from entire male pigs. Milton Keynes, United Kingdom, 25-29 September, 1995*
- Wilkins, C. K. (1990). Analysis of indole and skatole in porcine gut contents. *International J. Food Sci. Tech.*, 25: 313
- Williamson, E. D. y Patterson, R. L. S. (1982). A selective immunization procedure against 5 $\alpha$ -androstenone in boars. *Anim. Prod.*, 35: 353
- Williamson, E. D. ; Patterson, R. L. S. ; Buxton, E. R. ; Mitchell, K. G. ; Partridge, I. G. y Walker, N. (1985). Immunization against 5 $\alpha$ -Androstenone in boars. *Livest. Prod. Sci.*, 12: 251
- Xue, J. L.; Dial, G. D.; Marsh, W. E.; Squires, E. J.; Bartsh, S. y Ferre, G. (1993). Influence of a GnRH agonist on circulating levels of LH and tissue levels of compounds associated with boar taint. In: *Proceedings of a Meeting of the EAAP Working Group. Production and utilisation of meat from entire male pigs, (Ed. M. Bonneau), INRA, Paris, Les Colloques, n<sup>o</sup> 60, 213*
- Xue, J. L.; Dial, G. D.; Bartsh, S.; Kerkaert, B.; Squires, E.; Marsh, W. E. y Ferre, G. (1994). Influence of a Gonadotropin-Releasing Hormone agonist on circulating concentrations of Luteinizing Hormone and testosterone and tissue concentrations of compounds associated with boar taint. *J. Anim.Sci.*, 72: 1290
- Xue, J. L.; Dial, G. D. y Morrison, R. B. (1996). Comparison of the accuracies of chemical and sensory tests for detecting taint in pork. *Livest. Prod. Sci.*, 46: 203
- Yost, G. S. (1989). Mechanisms of 3-methylindole pneumotoxicity. *Chem. Res. Toxicol.*, 2: 273
- Young, O. A.; Berdagué, J. L.; Viallon, C.; Rousset-Akrim, S. y Theriez, M. (1997). Fat-borne volatiles and sheepmeat odour. *Meat Sci.*, 45: 183

Zabolotsky, D. A.; Chen, L. F.; Patterson, J. A.; Forrest, J. C.; Lin, H. M. y Grant, A. L. (1995). Supercritical carbon dioxide extraction of androstenone and skatole from pork fat. *J. Food Sci.*, 60: 1006