

APLICACIÓN DE LA LENGUA ELECTRÓNICA EN LA EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE



MASTER EN GESTIÓN Y SEGURIDAD ALIMENTARIA

Elena Pérez Salinas

Raúl Grau Melo
Jose Manuel Barat Baviera
Directores

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural

APLICACIÓN DE LA LENGUA ELECTRÓNICA EN LA EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

Pérez Salinas, E.; Baldeón, E; Alcañiz, M; Barat, J.M.; Grau, R.

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue establecer un modelo matemático de predicción, mediante la aplicación de la lengua electrónica (voltametría de pulsos), para la evaluación de la capacidad antioxidante de alimentos. Para ello, en primer lugar se evaluó la capacidad antioxidante de disoluciones de trolox (patrón de referencia) y de muestras de té verde y de uva, mediante el método ABTS.

En segundo lugar se realizaron ensayos de voltametría cíclica para caracterizar la lengua electrónica en presencia de antioxidantes como el trolox, con la finalidad de conocer cuáles son los fenómenos electroquímicos que se producen entre los electrodos de trabajo y estos. Mediante esta caracterización se estableció el patrón de pulsos que se aplicó posteriormente en los ensayos de voltametría de pulsos sobre las disoluciones de trolox, de té y de uva.

Para evaluar la capacidad de la lengua electrónica como método para generar modelos predictivos que cuantifiquen la capacidad antioxidante, se llevaron a cabo análisis estadísticos multivariantes de componentes principales (PCA) y de análisis por mínimos cuadrados parciales (PLS). Los resultados obtenidos permitieron la creación de un modelo matemático válido para la evaluación de la capacidad antioxidante en base a equivalentes trolox. De entre los electrodos utilizados, los metales nobles fueron los que generaron el modelo con un mejor ajuste (superior al 94%).

Los metales no nobles, si bien mostraron un comportamiento directamente proporcional entre la respuesta electrónica generada y la concentración de zumo de uva testada, esta no fue relacionada con la capacidad antioxidante, por lo que futuros estudios irán encaminados a evaluar que compuestos son los que puedan generar esta correlación, así como a la cuantificación de la capacidad antioxidante en base a equivalentes ácido ascórbico, compuestos fenológicos, etc.

RESUM

L'objectiu d'aquest treball va ser establir un model matemàtic de predicció, mitjançant l'aplicació de la llengua electrònica (voltametria de polsos), per a l'avaluació de la capacitat antioxidant d'aliments. Per aqò, en primer lloc, es va avaluar la capacitat antioxidant de dissolucions de trolox (patró de referència), de mostres de té i de raïm, mitjançant el mètode ABTS.

En segon lloc, es realitzaren assajos de voltametria cíclica per a caracteritzar la llengua electrònica en presència d'antioxidants com el trolox, amb la finalitat de conèixer quins són els fenòmens electroquímics que es

produeixen entre els elèctrodes de treball i estos. Mitjançant esta caracterització es va establir el patró de polsos que es va aplicar posteriorment als assajos de voltametria de polsos sobre les dissolucions de trolox, té i raïm.

Per avaluar la capacitat de la llengua electrònica com mètode per a generar models predictius que quantifiquen la capacitat antioxidant es varen fer anàlisi estadístics multivariants de components principals (PCA) i d'anàlisi per mínims quadrats parcials (PLS). Els resultats obtinguts varen permetre la creació d'un model matemàtic vàlid per a l'avaluació de la capacitat antioxidant en base a equivalents trolox. Entre els elèctrodes utilitzats, els metalls nobles varen ser els que generaren el model amb un millor ajust (superior al 94%).

Els metalls no nobles, si bé mostraren un comportament directament proporcional entre la resposta electrònica generada i la concentració de suc de raïm testada, esta no fou relacionada amb la capacitat antioxidant, pel que els futurs estudis aniran encaminats a avaluar què compostos són els que poden generar esta correlació, així com a la quantificació de la capacitat antioxidant en base a equivalents àcid ascòrbic, compostos fenològics, etc.

ABSTRACT

The aim of this work was establishing a mathematical prediction model through the application of electronic tongue (pulse voltammetry) in order to assess the antioxidant capacity of food. For that purpose, firstly, the antioxidant capacity of trolox solutions (reference standard), as well as samples of tea and grape, were evaluated using the method ABTS.

Secondly, cyclic voltammetry tests were conducted to characterize the electronic tongue in the presence of antioxidants as trolox, with the purpose of knowing the electrochemical phenomena generated between the work electrodes and these. Through this characterization, a pulse standard was established and subsequently applied to the pulse voltammetry tests on the trolox, tea and grape solutions.

In order to assess the capacity of electronic tongue as a method to generate predictive models that can quantify the antioxidant capacity, statistical multivariate analysis of the main components (PCA) and partial least squares analysis (PLS) were carried out. The obtained results made the creation of a valid mathematic model for the assessment of the antioxidant capacity possible on the basis of trolox equivalents. From all the electrodes used, noble metals generated the model with the best adjustment (94%).

Although non-noble metals showed a directly proportional behaviour between the generated electronic response and the grape juice concentration subjected to test, such a response was not related to their antioxidant capacity. Therefore, future studies will be aimed at evaluating which compounds can generate this correlation, as well as the quantification of the antioxidant capacity based on equivalents of ascorbic acid, phenological compounds, etc.

PALABRAS CLAVE: Lengua electrónica, voltametría, ABTS, trolox, uva, té.

1. INTRODUCCIÓN.

La información que relaciona a los antioxidantes con una buena salud es ya conocida y manejada por un amplio sector de la población, la cual se preocupa por adquirir alimentos con un alto contenido en estos como por ejemplo frutas y verduras.

Los antioxidantes más representativos en la dieta humana son el ascorbato (vitamina C), los tocoferoles (vitamina E), los carotenoides (vitamina A) y los flavonoides. (Gomez-Cabrera y Viña, 2003).

Además de por su papel como componente en la dieta, los antioxidantes son importantes en la industria alimentaria como conservantes de alimentos puesto que son sustancias que pueden utilizarse como aditivos para impedir o retardar, en alimentos y bebidas, las oxidaciones catalíticas y procesos que llevan a enranciamientos naturales o provocados por acción del aire, temperatura, luz o residuos metálicos.

En los últimos años la evaluación de la capacidad antioxidante ha cobrado un especial interés, existiendo una amplia gama de métodos para su análisis debido a que esta propiedad es generada por moléculas de diversos tipos con diferente estructura. Por ejemplo, para determinar los antocianos totales (AT) se utiliza un método basado en la diferencia de pH que permite la estimación alternativa del contenido de estos compuestos. En cambio, para medir los fenoles totales (taninos, compuestos fenólicos simples, flavonoides, etc.) se emplea el método espectrofotométrico desarrollado por Folin y Ciocalteau (1927) que se fundamenta en su carácter reductor (Kuskoski et al., 2005).

Además de las técnicas anteriores se han desarrollado diversos métodos para evaluar la actividad antioxidante, entre ellos destacan el método FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) que mide la actividad reductora del catión férrico (Fernández, 2011), el método DPPH desarrollado por Brand-Williams et al (1995) basado en la reducción de la absorbancia medida a 515 nm del radical DPPH• por antioxidantes y el método ORAC (Oxygen Radical Absorption Capacity) que mide el grado de inhibición de la oxidación peroxy-radical reducida por componentes de interés (Haytowitz y Bhagwat, 2010).

Otro de los métodos más empleados es el ABTS. Esta técnica fue desarrollada por Re et al. (1999) y descrita por Kuskoski et al. (2004). Está basada en la cuantificación espectrofotométrica de la reducción de un radical estable preformado (ABTS^{•+}).

Si bien todos estos métodos aportan información válida acerca de la capacidad total antioxidante de sustancias, esta no es suficiente, por lo que técnicas como la voltametría podrían incrementarla (Shlomit C. et al., 2000).

Las lenguas electrónicas, que a pesar de que su planteamiento y desarrollo es muy reciente (Leake, 2006), están cobrando una enorme importancia por su alta especificidad y selectividad, sencillez, coste relativamente bajo de construcción y almacenamiento, rápida respuesta y por la posibilidad de automatización, lo que permite su aplicación a diferentes tipos de muestras (Mello y Kubota, 2002)

Inicialmente esta técnica comenzó a aplicarse sobre alimentos líquidos, por ejemplo para clasificar diversos tipos de bebidas como vinos, cervezas,

café, leches y zumos de fruta (Schreyer y Mikkelsen, 2000), clasificar cervezas de distintas marcas entre rubias y negras (Arrieta et al., 2010) y para el análisis de té (Ivarsson et al., 2001). Posteriormente se empezaron a utilizar en extractos de alimentos sólidos como uva y frambuesa (Aguirre et al., 2010) y más recientemente sobre productos sólidos como la carne (Campos et al., 2010)

Las lenguas electrónicas se pueden definir como sistemas basados en múltiples sensores de baja selectividad o sensibilidad cruzada que, conjugados con herramientas de reconocimiento de patrones o de análisis multivariante, permiten la clasificación de muestras o cuantificación de alguno de sus parámetros fisicoquímicos (Gutés et al., 2007)

Una lengua electrónica se compone de tres elementos: los sensores, el sistema de medida y el sistema de procesamiento de datos, tal y como se indica en la figura 1. Los sensores, por lo general, tienen una sensibilidad cruzada a los distintos compuestos de la muestra y su número depende de la aplicación y de la técnica empleada. La misión del sistema de medida es captar las señales generadas por dichos sensores, digitalizarlas y transmitir las al sistema de procesamiento de datos, el cual basándose en algoritmos de reconocimiento de patrones o en herramientas de análisis multivariante, clasifica las muestras o cuantifica alguna de sus características fisicoquímicas. Previamente se debe realizar un proceso de aprendizaje en el que muestras de características conocidas son procesadas para “entrenar” al sistema.

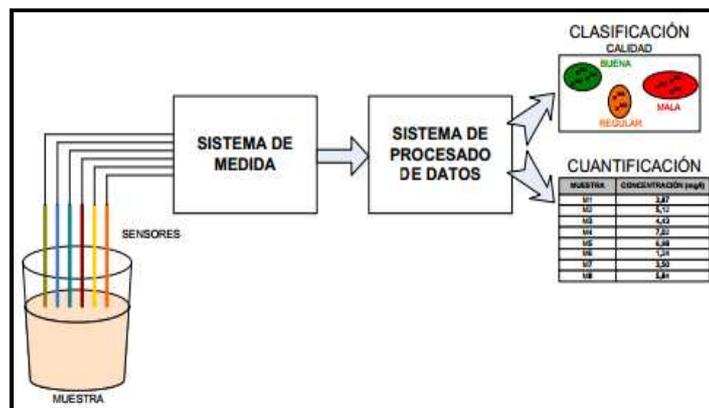


FIGURA 1. Estructura de la lengua electrónica (Alcañiz, 2011)

Existen diferentes tipos de lenguas electrónicas. Las más utilizadas son las potenciométricas y las voltamétricas pero también se pueden encontrar las impedimétricas, las basadas en ondas acústicas y las ópticas.

En este trabajo se ha empleado el sistema de lengua voltamétrica, que consta de los tres electrodos siguientes:

- Contraelectrodo o electrodo auxiliar (CE o AE): su misión es permitir la circulación de la corriente hacia el electrodo de trabajo.
- Electrodo de referencia (RE): debe ser muy estable a los cambios de concentración en la disolución, de manera que la tensión en él pueda considerarse constante.

- Electrodo de trabajo (WE): es el electrodo sobre el que se realizan las medidas.

En esta técnica se aplica una tensión controlada a la interfaz electrodo-disolución del electrodo de trabajo. Para poder controlar dicha tensión el sistema se diseña con un potencióstato. A continuación se mide la corriente que circula por dicho electrodo y posteriormente se procesan los datos correspondientes a la evolución temporal de la corriente mediante técnicas de análisis multivariante (Alcañiz, 2011).

Así en el presente trabajo se establece como objetivo el desarrollo de un modelo matemático de predicción, mediante la aplicación de las lenguas electrónicas (voltametría de pulsos), para la evaluación de la capacidad antioxidante de alimentos.

2. MATERIAL Y MÉTODOS.

2.1. Materia prima.

En el presente trabajo se evaluó la capacidad antioxidante de dos materias primas distintas, té verde deshidratado (Té de Vietnam: *Che Tuyet*) y uva tinta (variedad *Red Globe*) (Figura 2), ambos adquiridos en supermercados.



FIGURA 2. Materia prima: Uva tinta (izquierda); Té verde (derecha).

2.2. Preparación de las muestras.

Para el análisis de las muestras de uva y de té fue necesario presentarlas en forma líquida, por lo que se procesaron según se indica en la figura 3.

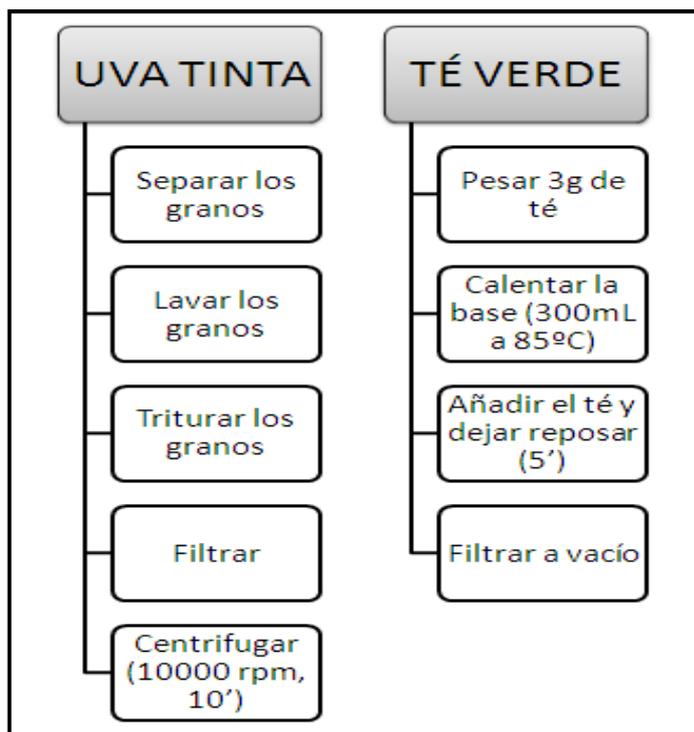


FIGURA 3. Diagramas de elaboración de las muestras de té y uva.

Una vez obtenidas las soluciones se realizaron diferentes diluciones de estas (Tabla 1) con la finalidad de testar la influencia del factor dilución en las medidas voltamétricas.

Tanto el extracto de té como las diluciones de té y uva se realizaron utilizando una base cuya función es facilitar la circulación de la corriente entre el contraelectrodo y el electrodo de trabajo de forma que puedan ser medidos los fenómenos electroquímicos que se puedan generar en este último. La base utilizada fue una mezcla de fosfato de potasio y dihidrógeno fosfato de potasio 0.01 M, ajustada a pH 7.4. Se utilizó esta base, a esta concentración, porque en estudios previos se había mostrado como la base que a menor concentración presentaba un buen paso de corriente y porque posteriormente facilitaba el análisis de la capacidad antioxidante mediante un método contractado (ABTS).

TABLA 1. Diluciones de las muestras de té y uva.

Nº MUESTRA	DILUCIÓN (%)
1	100 (Puro)
2	20
3	10
4	5

Con la finalidad de salvaguardar las muestras para su análisis por voltametría o por el método ABTS, estas fueron almacenadas a -45°C en recipientes opacos. Para proceder a su medida se dejaban atemperar hasta alcanzar la temperatura ambiente resguardadas de la luz.

2.3. Evaluación de la capacidad antioxidante mediante el método ABTS.

La determinación de la capacidad antioxidante, tanto del trolox, sustancia de referencia en la determinación de la capacidad antioxidante y utilizada para la obtención del modelo, como del extracto de té y de uva, se realizó mediante el método ABTS (Re et al., 1999; Kuskoski et al., 2004.)

El método ABTS es un método muy reproducible, fácil de desarrollar, flexible ya que se puede aplicar en diferentes medios, tanto acuosos como orgánicos, que puede ser utilizado en un amplio rango de pH y en el que además la reacción que se genera con los antioxidante es suave (Fernández, 2011).

El método ABTS mide la capacidad antioxidante en equivalentes de trolox (6 - hidroxil- 2, 5, 7, 8 – tetrametilcromo - 2 - ácido carboxílico) el cual es un análogo hidrosoluble del alfa-tocoferol (vitamina E) con un alto poder antioxidante.

El procedimiento seguido fue desarrollado por Re et al., (1999) descrito por Kuskoski et al. (2004) y modificado durante la realización del trabajo con la finalidad de ajustarlo a la base utilizada. El método se basa en la cuantificación espectrofotométrica de la reducción de un radical estable preformado ($\text{ABTS}^{\bullet+}$).

En primer lugar se preparó la solución madre de trabajo de color azul-verde intenso, para ello se mezclaron dos reactivos a partes iguales (ABTS^+ y persulfato de potasio). La solución se dejó reaccionar 12 horas en oscuridad a temperatura ambiente. Pasado el tiempo se diluyó en la base y se ajustó hasta que su lectura a 734 nm fuera de 1.1 ± 0.02 .

En segundo lugar se procedió a obtener la recta de calibrado (concentración trolox vs capacidad antioxidante). Para ello se prepararon disoluciones de trolox (0.1, 0.25, 0.5, 1.25, 2.5 y 5 mM) sobre una base de fosfato de potasio y dihidrógeno fosfato de sodio 0.01 M y a pH 7.4. El rango de concentraciones se estableció con la finalidad de que fuera lo suficientemente alto para que las señales de voltametría que se realizarían más adelante permitiesen la generación de un modelo de predicción fiable y robusto y que por otro lado, fuesen lo bastante bajas como para poder ser medidas mediante la técnica ABTS.

La cuantificación de la capacidad antioxidante de las disoluciones se realizó mezclando 150 μl de cada disolución con 2850 μl de ABTS diluido, dejando reaccionar durante 30 minutos en agitación a 20°C . Transcurrido el tiempo, las diluciones se midieron a 734 nm, utilizándose como blanco la base fosfato.

En el caso de las muestras de té y uva, estas fueron diluidas con la base hasta que la concentración fuera tal que pudiese ser evaluada mediante la recta obtenida con la solución trolox.

2.4. Medidas con el equipo de voltametría (lengua electrónica).

El equipo utilizado en esta parte del trabajo fue diseñado por el grupo de Microelectrónica Híbrida del Instituto de Química Molecular Aplicada de la UPV. Dicho equipo consta de los siguientes componentes:

- Aplicación informática.
- Software que permite realizar ensayos y almacenar los datos obtenidos.
- Equipo de medida. En este caso se emplearon 8 electrodos de trabajo agrupados en 2 lenguas electrónicas, la primera formada por metales nobles (Ir, Rb, Pt, Au) y la segunda por metales no nobles (Ag, Co, Cu, Ni). Los electrodos de trabajo estaban encapsulados en un cilindro de acero inoxidable (contraelectrodo) mediante un epoxi, tal y como se muestra en la siguiente figura. Además se utilizó un electrodo de referencia de calomelanos estable a los cambios de concentración.

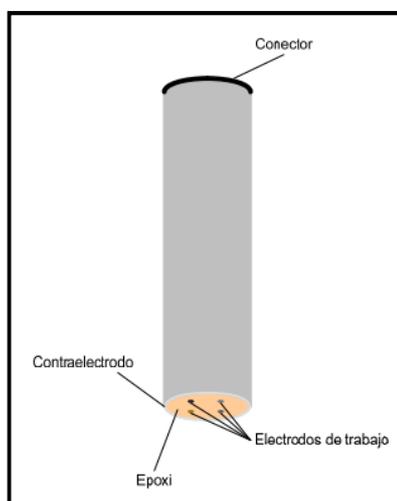


FIGURA 4. Lengua electrónica (Alcañiz, 2011)

El equipo puede utilizarse para realizar medidas de voltametría cíclica y de pulsos, en ambos casos es necesario tener en cuenta las siguientes precauciones antes de empezar a realizar las medidas.

En primer lugar el contacto entre el electrodo y la disolución debe ser el adecuado, ya que la señal de corriente obtenida está relacionada directamente con la superficie de contacto.

En segundo lugar hay que realizar una limpieza correcta de los electrodos porque durante las medidas se producen reacciones de oxidación, reducción, corrosión, etc. que forman una capa residual que ha de ser eliminada después de cada medida, sin alterar la superficie del electrodo, para evitar variaciones de la señal en las siguientes.

El proceso de limpieza es diferente según el electrodo del que se trate. Al formado por los metales no nobles se le realiza un lijado intenso, y dado que este paso produce irregularidades a continuación se lleva a cabo un pulido con alúmina para homogeneizar la superficie. En cambio, al formado por metales nobles solamente se le realiza el pulido con alúmina.

2.4.1. CARACTERIZACIÓN DE LA LENGUA ELECTRÓNICA EN PRESENCIA DE ANTIOXIDANTES.

Con la finalidad de conocer cuáles son los fenómenos electroquímicos que se producen entre los electrodos de trabajo y el trolox, a fin de desarrollar el patrón de pulsos que posteriormente será aplicado en la determinación de la capacidad antioxidante, se realizaron ensayos de voltametría cíclica. Esta técnica consiste en aplicar al electrodo un potencial que aumenta de forma lineal y una vez alcanza el potencial máximo se realiza un nuevo barrido en sentido contrario hasta alcanzar el valor inicial (Alcañiz, 2011).

La evolución de la corriente en función de la tensión aplicada se representa en forma de voltagrama, que indica cuáles son los fenómenos o comportamientos más característicos que se producen, en función de los cuales se desarrolló el patrón de pulsos.

La técnica se aplicó inicialmente sobre la base fosfato y posteriormente sobre 2 de las disoluciones de trolox (0.1mM y 5mM).

2.4.2. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE MEDIANTE VOLTAMETRÍA DE PULSOS.

Una vez diseñado el patrón de pulsos se realizaron los ensayos de voltametría de pulsos sobre las diluciones de trolox así como sobre las de té y uva. En esta técnica se aplica al electrodo una tensión en pequeños escalones o pulsos cuyo nivel va aumentando o disminuyendo en función del patrón de pulsos utilizado (Figura 8). Al mismo tiempo se mide la corriente resultante y sus valores se utilizarán posteriormente para el análisis estadístico (Alcañiz, 2011).

Una vez configurado el equipo se realizaron los ensayos, siendo el número de medidas que el equipo realizó sobre cada uno de los pulsos de 45. Así se obtuvieron los valores voltamétricos para cada pulso y para cada metal. Con la finalidad de reducir la heterogeneidad de las medidas, estas se repitieron un número determinado de veces hasta que al menos 6 medidas tuviesen una desviación de su media inferior a 4.

2.5. Análisis estadístico.

Para evaluar la capacidad de las lenguas electrónicas como método para cuantificar la capacidad antioxidante de alimentos se llevaron a cabo varios análisis multivariantes mediante el programa Matlab (The Mathworks, Natick, Massachussets, USA) y su aplicación estadística PLS Toolbox (Eigenvector Reserach Inc., Wenatchee, Washington, USA).

En primer lugar se realizaron análisis de los componentes principales (PCA) para poder visualizar los datos de forma sencilla y detectar posibles datos anómalos (outliers) cuyo comportamiento difiere del resto.

En segundo lugar se hicieron análisis de mínimos cuadrados parciales (PLS) que maximizan la correlación entre variables independientes (señal de corriente) y dependientes (capacidad antioxidante) (Martens & Martens,

2001). El objetivo es generar un modelo (basado en el parámetro de referencia "Trolox") que permita cuantificar dicha capacidad en nuevas muestras a partir de los valores de las medidas obtenidas por voltametría de pulsos.

La bondad del modelo y de la predicción de las muestras (extracto de té y zumo de uva) se evaluó a partir de los valores del coeficiente de regresión (R^2) y la desviación del modelo por el cálculo de la raíz de mínimos cuadrados (RMSE). Así se obtuvieron R^2 y RMSE para la calibración (C) y crossvalidación (CV) en la evaluación del modelo y de predicción (P) para las muestras de té y uva. El modelo de crossvalidación usado fue el denominado "Venetians Blind".

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

3.1. Evaluación de la capacidad antioxidante por el método ABTS.

En la siguiente figura se muestra la capacidad antioxidante de las disoluciones de trolox en base a unidades trolox (mM) determinada mediante la técnica ABTS. Como se puede observar, cuanto mayor fue la concentración de trolox menor fue su absorbancia y por tanto, mayor fue la diferencia respecto al blanco. Esto se debe a que el trolox se une al radical $ABTS^{*+}$, el cual pasa de un color verde-azul intenso a transparente. Es esta pérdida de color la que se mide espectrofotométricamente para evaluar la capacidad antioxidante en equivalentes de trolox.

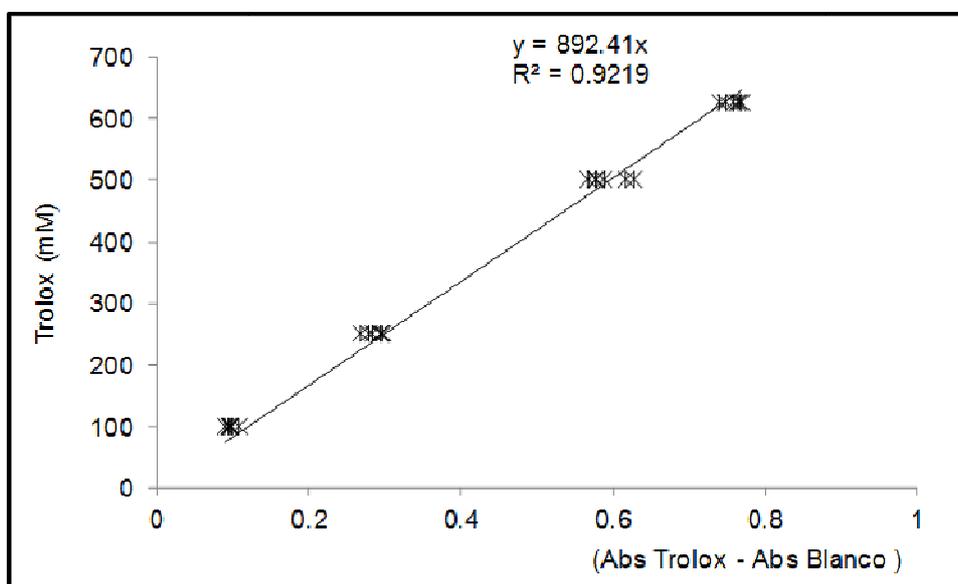


FIGURA 5. Recta de calibrado de trolox mediante la técnica ABTS

Una vez obtenida la recta de calibrado en base trolox ($Trolox_{(mM)} = 892.41 \times (ABS_{Antioxidante} - ABS_{Blanco})$), se realizaron las medidas sobre los extractos de té y uva. Obtenidos los valores de absorbancia para ambos, estos fueron

introducidos en la ecuación y tras tener en cuenta el factor dilución se obtuvo la capacidad antioxidante en equivalentes trolox para el té (42883.28 Eq. trolox (mM)/100g té) y para la uva (5297.35 Eq. Trolox (mM)).

3.2. Caracterización de la lengua electrónica en presencia de antioxidantes.

Los voltagramas obtenidos para las soluciones de trolox testadas (0.1 y 5 mM) mediante los ensayos de voltametría cíclica, se representaron agrupados por electrodos para poder apreciar los fenómenos que se produjeron en cada uno de ellos.

En las figuras 6 y 7 se muestran dos de los voltagramas más representativos, el de níquel y oro respectivamente. Como se aprecia en ambos la base tuvo un comportamiento plano, es decir, no influyó sobre la respuesta a la presencia de trolox.

En el caso del voltagrama para el electrodo de níquel (Figura 6), la presencia de trolox en la base (líneas verde y azul) no generó un cambio importante en este, comparándolo con el obtenido sólo para la base (línea roja). En cambio, en el voltagrama obtenido para el oro (Figura 7) sí se apreciaron varios fenómenos característicos. Como se puede observar en él, conforme la tensión que se aplicó aumentó, la corriente resultante fue haciéndose cada vez más positiva, debido probablemente a las reacciones de oxidación. Por el contrario, cuando la tensión se hizo más negativa, la corriente también lo hizo a causa de las reacciones de reducción (Alcañiz, 2011).

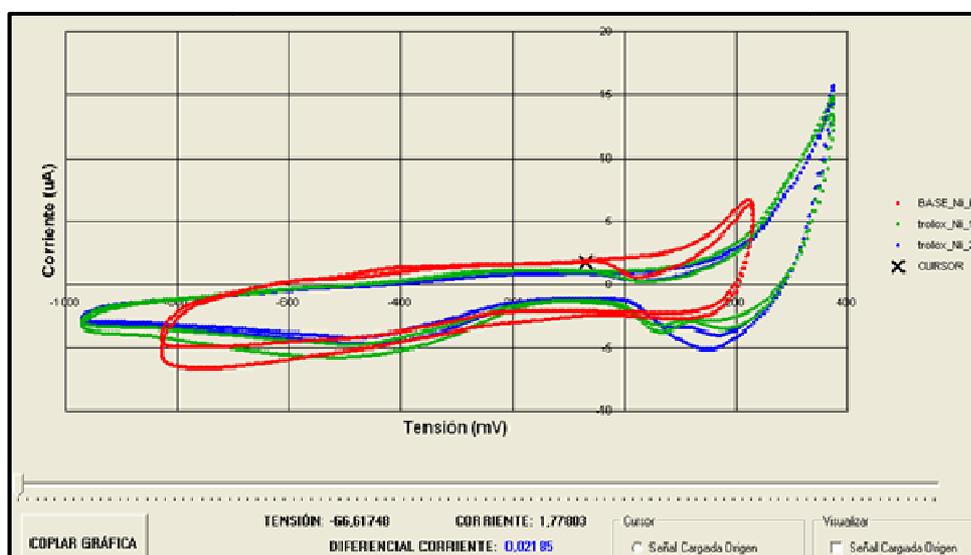


FIGURA 6. Voltagrama cíclico del electrodo de níquel.

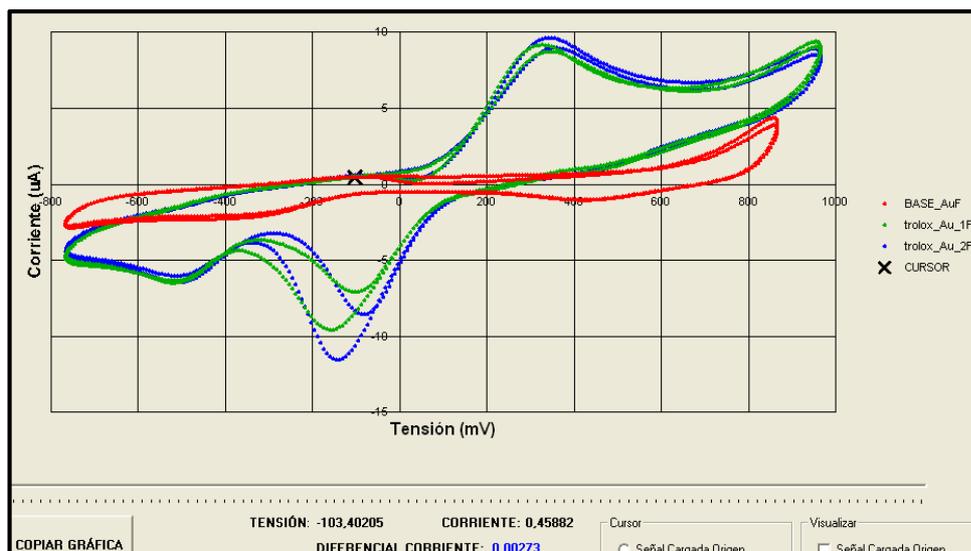


FIGURA 7. Voltograma cíclico del electrodo de oro.

Tras el estudio del comportamiento de todos los electrodos, se definió cual iba a ser el tren de pulsos a aplicar a todos ellos. Si bien hubo metales, como en el caso del níquel, cuya información aportada era escasa, se decidió utilizar todos los electrodos en el estudio.

Así el tren de pulsos definido (Figura 8) fue el comprendido entre 1000 y -1000 mV. Se definieron valores crecientes y decrecientes, tanto positivos como negativos, ya que la mayoría de electrodos presentaron comportamientos característicos para tensiones positivas y negativas. El patrón fue formado por un carrusel de 22 pulsos, los cuales fueron aplicados a cada uno de los 8 metales que conforman la lengua. En cada uno de los pulsos el equipo realizó 45 medidas, lo que hizo un total de 990 medidas, las cuales se realizaron hasta que la desviación estándar del promedio de éstas (en las muestras a medir), para 6 repeticiones, fuese menor de 4.

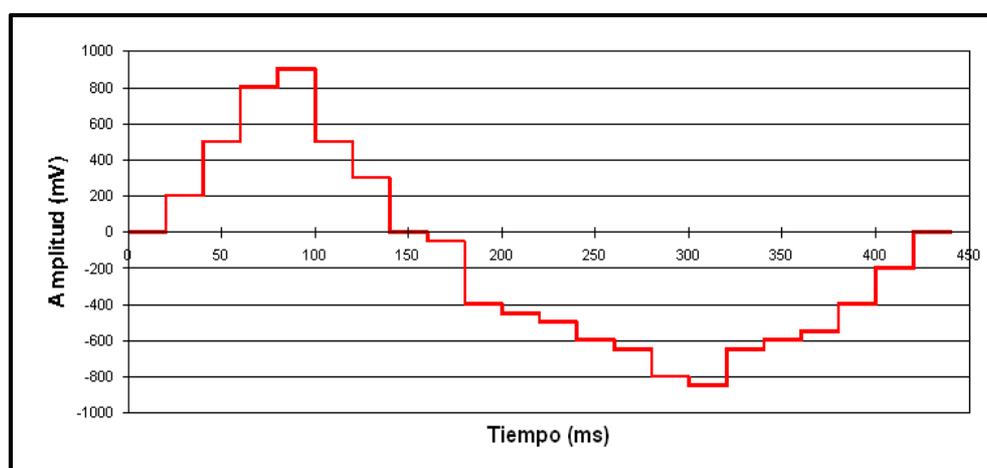


FIGURA 8. Patrón de pulsos.

3.3. Evaluación de la capacidad antioxidante mediante voltametría de pulsos.

Una vez realizados todos los ensayos de voltametría de pulsos se recogieron los datos obtenidos y se procedió a su análisis estadístico. En la figura 9 se muestra, a modo de ejemplo, la evolución temporal de la señal de corriente (voltagramas) para todos los electrodos empleados y para todos los pulsos para las disoluciones de trolox testadas.

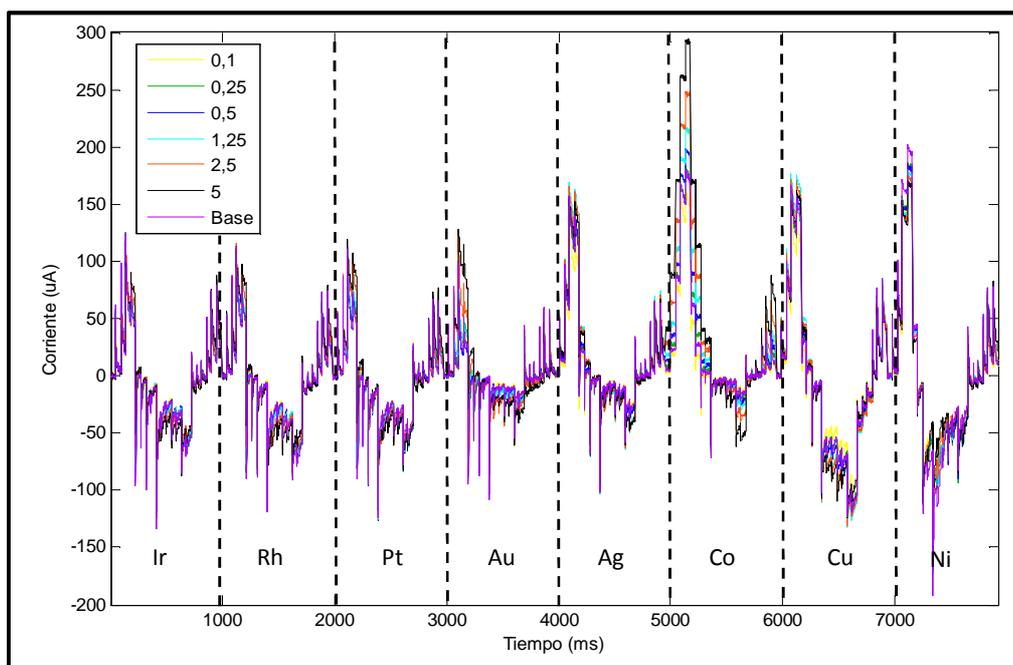


FIGURA 9. Evolución temporal de la señal de corriente de todos los electrodos para las disoluciones de trolox.

Para el análisis estadístico de los datos, en primer lugar se analizaron aquellos correspondientes a los ensayos realizados con las disoluciones de trolox y así poder crear el modelo matemático de predicción para la evaluación de la capacidad antioxidante. Para ello se llevó a cabo un análisis de los componentes principales (PCA) para visualizar todos los datos y detectar los posibles “outliers” que se hubieran producido.

Tras comprobar los datos se realizó un análisis de mínimos cuadrados parciales (PLS). Como se observa en la tabla 2 los altos valores de los coeficientes de correlación y de crossvalidación obtenidos en el estudio PLS ($R^2C=0.999$ y $R^2CV=0.996$) y el bajo valor de la raíz de mínimos cuadrados (RMSE) mostraron la bondad del ajuste y por tanto del modelo de predicción obtenido. En la figura 10 se muestra la gráfica PLS en la que en el eje X se representan los valores de capacidad antioxidante de las diferentes concentraciones de trolox medidas por la técnica ABTS frente a los valores predichos en la crossvalidación (eje Y) obtenidos mediante el modelo matemático generado.

TABLA 2. Resultados de la validación del modelo PLS para las disoluciones de trolox.

Disoluciones de trolox	
Num. LVs	3
RMSEC	0.055
R ² Cal	0.999
RMSECV	0.114
R ² CV	0.996

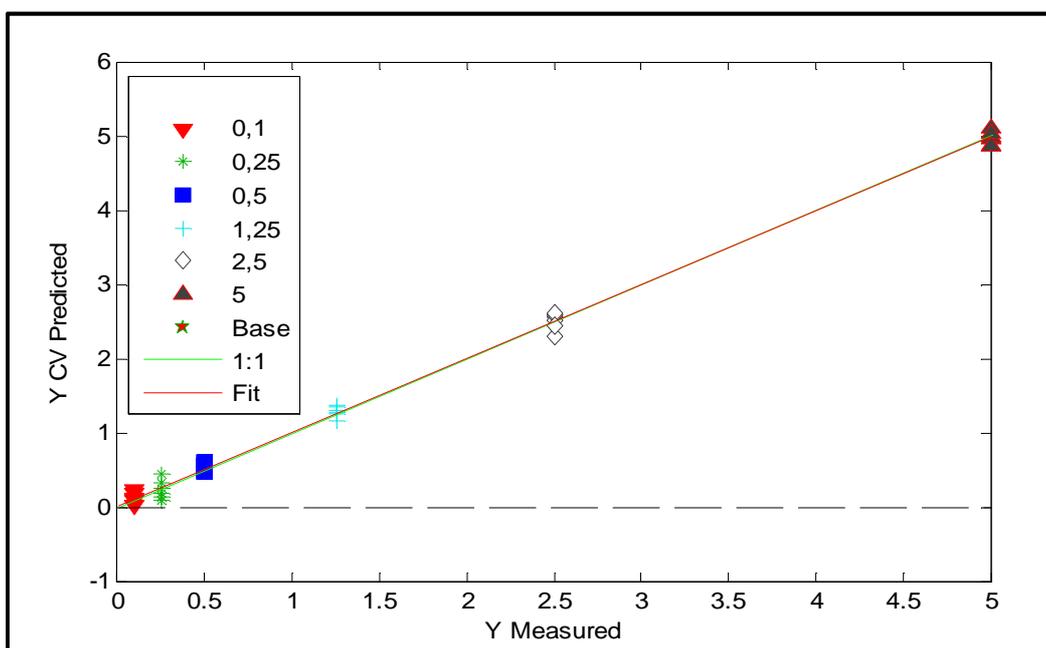


FIGURA 10. Gráfica PLS para los valores de capacidad antioxidante de las disoluciones de trolox obtenidos por la técnica ABTS frente a los valores de observado por la crovalidación a partir del modelo matemático generado.

El buen comportamiento del modelo generado ya se intuyó cuando se estudiaron los voltagramas de las soluciones de trolox (Figura 9). En ellos se observó como para algunos pulsos y metales existió un comportamiento lógico de la corriente en función de la concentración de trolox. Como se puede ver en la figura 11, a modo de ejemplo, en la que se ha ampliado el área del voltagrama de la figura 10 para los 5 primeros pulsos obtenidos para el electrodo de oro, al incrementarse la concentración se incrementó la señal de respuesta del equipo.

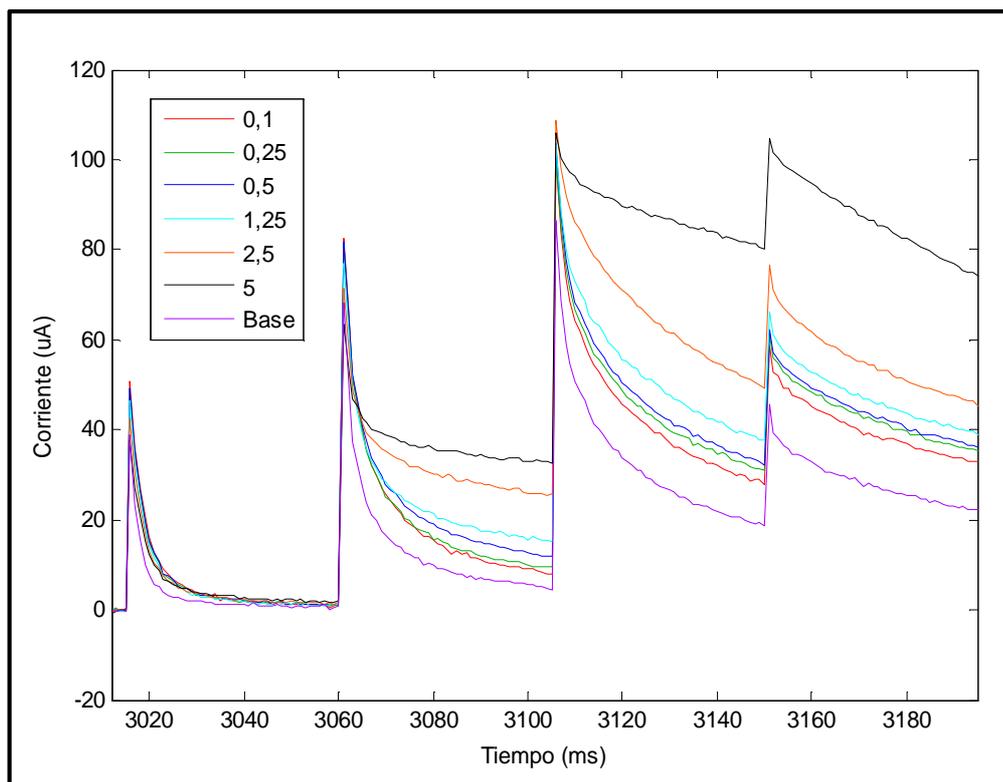


FIGURA 11. Evolución temporal de la señal de corriente para los 5 primeros pulsos del electrodo de oro para las disoluciones de trolox.

Una vez obtenido el modelo matemático de predicción de capacidad antioxidante en equivalentes trolox se aplicó para la predicción de las dos materias primas seleccionadas para este trabajo, té y uva.

En la figura 12 se muestra la gráfica PLS de predicción para el té. Como se puede observar, las disoluciones de té correspondientes al 20% y 100% se excluyeron del análisis de mínimos cuadrados parciales dado que su capacidad antioxidante fue tan elevada que mostraron un comportamiento anómalo al modelo, dado que este está establecido para capacidades antioxidantes menores. En cambio, las concentraciones de 5 y 10% de té tuvieron un ajuste muy bueno, tal y como se puede observar (Tabla 3) en los valores de R^2 de calibración ($R^2C=0.993$), crossvalidación ($R^2CV=0.991$) y predicción ($R^2P=0.923$).

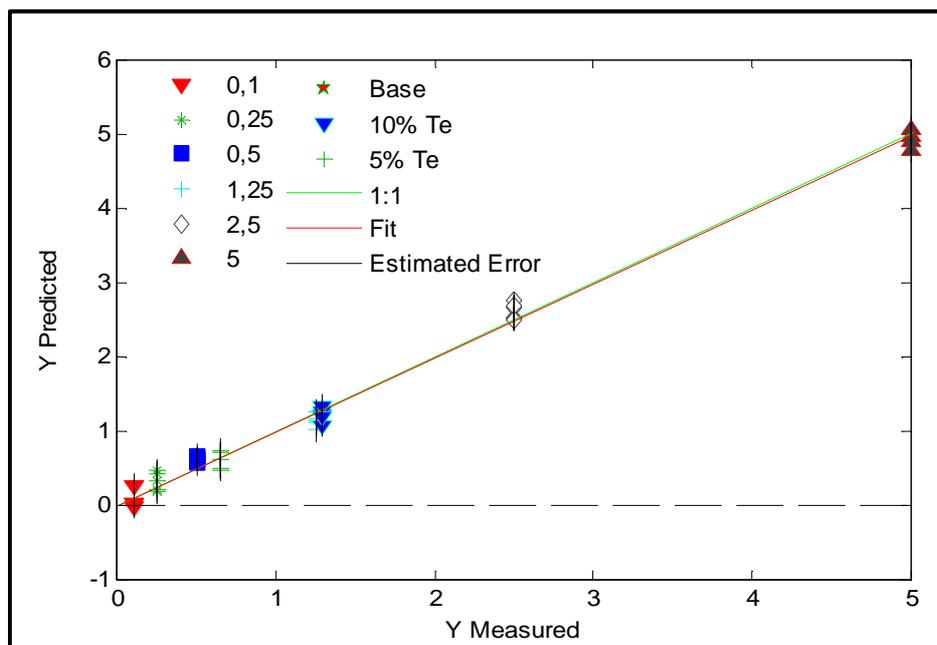


FIGURA 12. PLS de predicción para las disoluciones de té utilizando todos los electrodos.

Por otro lado los valores de predicción de la capacidad antioxidante de la uva no fueron los esperados. Como se observa en la tabla 3 el coeficiente de correlación de predicción fue de 0.7, siendo además el valor de la raíz cuadrada de la suma de los errores elevada (RMSE=3.413). Además en este caso también se tuvieron que tener en cuenta sólo las disoluciones de uva al 5 y 10%, despreciando en el estudio las de 20 y 100%, si bien la concentración en antioxidantes en todos los casos estaba dentro del rango de concentraciones en las que se obtuvo el modelo matemático.

Por tanto, el modelo matemático desarrollado no sería válido para la determinación de la capacidad antioxidante de la uva, dado que el error cometido en la predicción sería muy elevado.

TABLA 3. Resultados de la validación del modelo PLS para las disoluciones de té y uva utilizando todos los electrodos y pulsos.

Todos los electrodos		
	Té	Uva
Num. LVs	3	3
RMSEC	0.134	0.199
R ² Cal	0.993	0.986
RMSECV	0.157	0.223
R ² CV	0.991	0.983
RMSEP	0.099	3.413
R ² P	0.923	0.700

Con la finalidad de evaluar cual podría ser la diferencia entre los valores obtenidos para el té y para la uva, se analizaron los espectros voltamétricos del trolox, té y uva. Cuando se compararon metal a metal y se observó cual fue la respuesta de corriente, se evidenció que en el caso de los metales no nobles la respuesta para la uva fue mucho mayor que para el trolox y el té. En la figura 13, a modo de ejemplo, se muestra la diferencia entre la respuesta de corriente para el metal cobalto (pulsos 5 a 7) entre el trolox, té y uva. Como podemos observar la respuesta fue mucho mayor en el caso de la uva, llegando a producir señales de corrientes muy altas, de ahí que las concentraciones de 20 y 100% de uva diesen también resultados anómalos (saturación de señal). La mayor respuesta de los metales no nobles podría deberse a que estos podrían estar registrando otro tipo de reacciones, las cuales no se tuvieron en el caso del trolox y del té. Estas reacciones no estarían ligadas a la capacidad antioxidante (dado que no son registradas en el patrón trolox), sino que podrían estar ligadas a otros componentes del zumo de uva como por ejemplo azúcares. Próximos estudios podrán encaminarse en este sentido, más cuando se ha observado una relación entre la intensidad de corriente y la concentración del zumo de uva (Fig. 13).

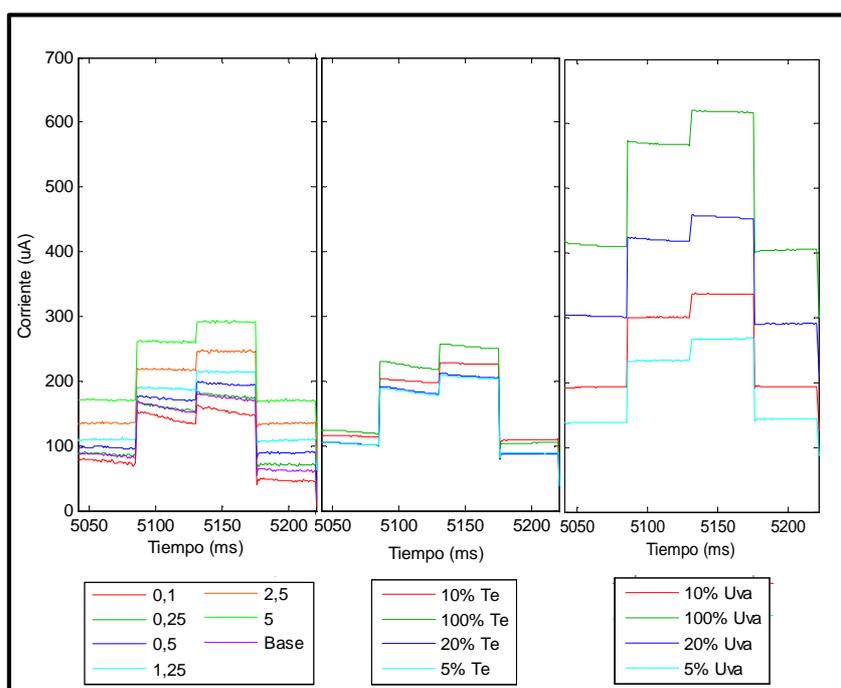


FIGURA 13. Evolución temporal de la señal de corriente del metal cobalto para los pulsos 5, 6 y 7 para las disoluciones de trolox, té y uva.

Establecida la no idoneidad del uso de los metales no nobles en el modelo matemático de predicción, se procedió a realizar el mismo pero sólo utilizando los electrodos de metales nobles.

En la tabla 4 se detallan los resultados de la validación del modelo PLS para las disoluciones de té y uva. En este caso, y con el fin de comparar los resultados con los obtenidos anteriormente (Tabla 3), se eliminaron las disoluciones del 20 y 100% de té y de uva. Como se observa, tanto para el

té como para la uva, los valores del coeficiente de correlación de predicción fueron muy buenos ($R^2P=0.947$; $R^2P=0.948$ respectivamente), así como los de la suma de la raíz cuadrada de los errores (RMSEP=0.176; 0.081). En el caso del té estos fueron incluso ligeramente superiores a los obtenidos con la utilización de todos los metales (Tabla 3). En la figura 14 se muestra la gráfica PLS de predicción para las muestras de uva. Como se puede observar, mediante el modelo matemático generado utilizando sólo los metales nobles, la capacidad antioxidante en base a equivalentes trolox de las muestras del 5 y 10% de uva fue muy buena.

TABLA 4. Resultados de la validación del modelo PLS para las disoluciones de té y uva utilizando sólo el electrodo con los metales nobles.

Electrodos con metales nobles		
	Té	Uva
Num. LVs	3	3
RMSEC	0.059	0.059
R^2 Cal	0.999	0.998
RMSECV	0.079	0.079
R^2 CV	0.999	0.997
RMSEP	0.176	0.081
R^2 P	0.947	0.948

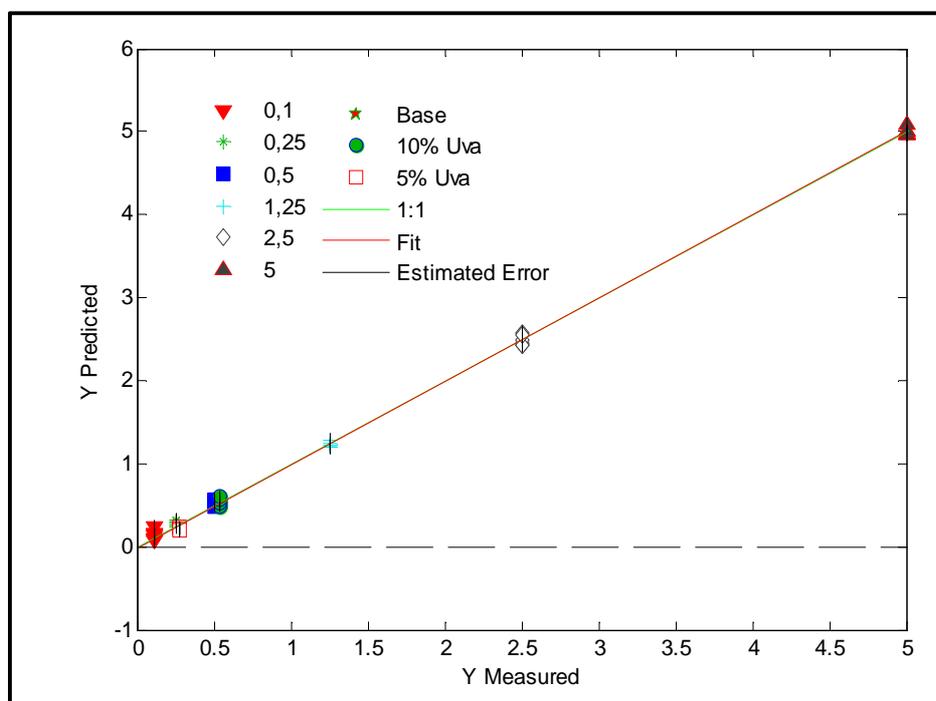


FIGURA 14. PLS de predicción para las disoluciones de uva utilizando los electrodos de metales nobles.

4. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos a partir de la aplicación de las lenguas electrónicas voltamétricas permitieron la creación de un modelo matemático válido para la evaluación de la capacidad antioxidante en base a equivalentes trolox.

La fiabilidad de dicho método fue demostrada mediante el análisis de dos materias primas, té verde y uva tinta. En ambos casos se obtuvieron resultados de predicción superiores al 94%. De entre los electrodos utilizados, los metales nobles fueron los que generaron el modelo con un mejor ajuste.

Los metales no nobles, si bien mostraron un comportamiento directamente proporcional entre la respuesta electrónica generada y la concentración de zumo de uva testada, esta no fue relacionada con la capacidad antioxidante, por lo que futuros estudios irán encaminados a evaluar qué compuestos son los que puedan generar esta correlación, así como a la cuantificación de la capacidad antioxidante en base a equivalentes de ácido ascórbico, compuestos fenólicos, etc.

5. AGRADECIMIENTOS

Quisiera dar las gracias a mis directores por haberme dado la oportunidad de realizar este trabajo, por sus consejos y por todo lo que me han enseñado. A Lupita y a Edwin por su constante ayuda y por motivarme con su interés por la investigación.

Por último, a mi familia y amigas por haber estado interesados desde el primer momento en mi trabajo y por el gran apoyo que han sido para mí durante este tiempo.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguirre, M.J.; Chen, Y.Y.; Isaacs, M.; Matsuhira, B.; Mendoza, L.; Torres, S. (2010) Electrochemical behaviour and antioxidant capacity of anthocyanins from Chilean red wine, grape and raspberry. *Food Chemistry* 121, 44-48.
- Alcañiz, M. (2011). Diseño de un sistema de lengua electrónica basado en técnicas electroquímicas voltamétricas y su aplicación en el campo agroalimentario.
- Arrieta, A.; Rodríguez-Méndez, M.L.; de Saja, J.A.; Blanco, C.A.; Nimubona, D. (2010) Prediction of bitterness and alcoholic strength in beer using an electronic tongue. *Food Chemistry* 123, 642-646.
- Brand-Williams, W.; Cuvelier, M.E.; Berset, C. (1995) Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. Technol.*, 22, 25-30.
- Compos, I.; Masot, R.; Alcañiz, M.; Gil, L.; Soto, J.; Vivancos, J. L.; García-Breijo, E.; Labrador, R.H.; Barat, J.M.; Martínez-Mañez, R. (2010). Accurate concentration determination of anions nitrate, nitrite and chloride in minced meat using a voltammetric electronic tongue. *Sensors and Actuators, B* 149, 71-78.
- Fernández, J.V. (2011). Barrido sistemático de la actividad antioxidante total y el contenido de compuestos fenólicos (flavonoides y fenoles totales) de alimentos vegetales.
- Folin, C.; Ciocalteu, V. (1927). Tyrosine and tryptophan determination in proteins. *J. Biol. Chem.* 73, 627-650.

- Gómez-Cabrera, M.C.; Viña, J. (2003). Ejercicio físico, entrenamiento y estrés oxidativo. Importancia de los nutrientes antioxidantes. *Alimentación, nutrición y salud*. Vol. 10, 71-81.
- Gutés, A.; Céspedes, F.; Del Valle, M. (2007). Electronic tongues in flow analysis. *Analytica Chimica Acta*, 600, 90-96.
- Haytowitz, D.B.; Bhagwat, S. (2010) Database for the Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) of Selected Foods, Release 2.
- Ivarsson, P; Holmin, S.; Höjer, N.; Krantz-Rülcker, C.; Winquist, F. (2001). Discrimination of tea by means of a voltammetric electronic tongue and different applied waveforms. *Sensors and Actuators B* 76, 449-454.
- Kuskoski, E.M.; Asuero, A.G.; Troncoso, A.M.; García-Parrilla, M. C.; Fett, R. (2004) Actividad antioxidante de pigmentos antocianicos. *Rev. Bras. Ciênc. Tecnol. Alim.*, v. 24, n.4, 691-693.
- Kuskoski, E.M.; Asuero, A.G.; Troncoso, A.M.; Mancini-Filho, J.; Fett, R. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, 25(4): 726-732.
- Leake, L.L. (2006). Electronic noses and tongues. *Food Technology*, 60(6), 96-102.
- Martens, H.; & Martens, M. (2001). *Multivariate Analysis of Quality. An Introduction*. John Wiley & Sons, Inc.
- Mello, L. D.; Kubota, L. T. (2002). Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries. *Food chemistry*, 77, 237-256.
- Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.*, 26, 9/10, 1231-1237.
- Schreyer, S.K.; Mikkelsen, S.R. (2000). Chemometric analysis of square wave voltammograms for classification and quantitation of untreated beverage samples. *Sensors and Actuators B* 71, 147-153.
- Shlomit C.; Matthew A. R.; Mordechal C. (2000). the use of cyclic voltammetry for the evaluation of antioxidant capacity. *Free Radical Biology & Medicine*, 28, 6, 860-870.