

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



APLICACIÓN DE SENSORES METÁLICOS EN LA IDENTIFICACIÓN DE LA ADICIÓN DE JARABES EN MIELES

TRABAJO FIN DE GRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

ALUMNA: ÁNGELA ISABEL GONZÁLEZ GARCÍA

TUTORA: MARÍA ISABEL ESCRICHE ROBERTO

COTUTOR: JUAN SOTO CAMINO

Curso Académico: 2014/2015

VALENCIA, 7 DE JULIO DE 2015

Licencia Creative Commons “Reconocimiento no Comercial –Sin Obra Derivada”



RESUMEN

La miel es uno de los alimentos más susceptible de ser adulterado. En el presente trabajo se ha evaluado la aptitud de un sistema de lengua electrónica, basado en técnicas electroquímicas (potenciometría, voltametría cíclica y voltametría de pulsos) con sensores metálicos, para la identificación de la adición de jarabes a la miel. La lengua electrónica empleada fue desarrollada por el Centro de Reconocimiento Molecular y Desarrollo Tecnológico (IDM) de la Universidad Politécnica de Valencia (UPV). Dicha lengua empleaba como electrodos de trabajo 8 sensores metálicos de reactividades diferentes: 4 metales nobles (Ir, Rh, Pt y Au) y 4 metales no nobles (Ag, Co, Cu y Ni). Se trabajó con 2 tipos de miel (girasol y brezo) y 3 tipos de jarabe (maíz, agave y caña) que se mezclaban en diferente proporción. Con la técnica potenciométrica no se obtuvieron buenos resultados. Sin embargo, las técnicas de voltametría, tanto cíclica como de pulsos, junto con herramientas estadísticas multivariantes (PCA) fueron capaces de identificar la adición de jarabes a las mieles. Además, el análisis de Regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS), permitió obtener buenos modelos de predicción.

PALABRAS CLAVE: miel, sensores, jarabes, adulteración.

ABSTRACT

Honey is one of the foods most likely to be adulterated. In this final degree work, it was evaluated the ability of an electronic tongue system, based on electrochemical techniques (potentiometry, cyclic voltammetry and pulse voltammetry) with metal sensors, for identifying adding syrup in honey. The electronic tongue used in this work, was developed by the Center for Molecular Recognition and Technological Development (IDM) of the Polytechnic University of Valencia (UPV). This tongue used 8 metal sensors with different reactivities, as working electrodes: 4 noble metals (Ir, Rh, Pt and Au) and 4 non-noble metals (Ag, Co, Cu and Ni). The work was developed with two types of honey (sunflower and heather) and 3 types of syrup (corn, agave and cane), that were mixed in different proportions. Potentiometric technique did not provide good results. However, voltammetric techniques, both cyclically and pulse, together with multivariate statistical tools (PCA), were able to identify adding syrup in honey. Furthermore, Partial Least Squares analysis (PLS), yielded good prediction models.

KEYWORDS: honey, sensors, syrups, adulteration.

AUTOR: Alumna Dña. Ángela Isabel González García

LOCALIDAD Y FECHA: Valencia, julio de 2015

TUTOR ACADÉMICO: Prof. Dña. M^a Isabel Escriche Roberto

COTUTOR: Prof. D. Juan Soto Camino

AGRADECIMIENTOS

El Trabajo Fin de Grado que se presenta a continuación ha sido realizado bajo la dirección de mi tutora, la Dra. D^a M^a Isabel Escriche Roberto, a quien quisiera expresar mi gratitud por hacerlo posible y apoyarme en su consecución, aportando su tiempo, dedicación y conocimientos, como también mi cotutor, el Dr. D. Juan Soto Camino.

Mi agradecimiento a Román, por su entrega y apoyo en el desarrollo de toda la fase experimental del trabajo.

Por último, y más importante, quiero dedicar este trabajo a mi familia, mi madre, mi hermano, Rafa, mis tíos, mi primo y mis abuelos, a mi novio David y a mi amiga Marta, porque su apoyo me ha permitido llegar a este lugar, por aguantarme en los malos momentos (que también los ha habido), por su incondicional ayuda ante todas las dificultades, y sobre todo, porque les quiero.

Angela Isabel González García. Valencia, julio 2015.

INDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. La miel.....	1
1.1.1. Definición e historia de la miel.....	1
1.1.2 Composición de la miel	1
1.2. Adulteración de mieles.....	3
1.3. Lengua electrónica	4
1.3.1. Componentes de la lengua electrónica.....	5
A. Sensores.....	5
B. Instrumento para adquirir la señal.....	6
C. Software.....	6
1.3.2. Funcionamiento de la lengua electrónica	7
A. Potenciometría	7
B. Voltimetría	8
2. OBJETIVOS	9
2.1. Objetivo principal	9
2.2. Objetivos específicos	9
3. MATERIALES Y MÉTODOS	11
3.1. Materia prima y preparación del diseño experimental.....	11
3.2. Dispositivo de lengua electrónica.....	12
3.2.1. Equipo de medida de potenciometría.....	12
3.2.2. Equipo de medida de voltimetría FraPlusMini.	12
3.2.3. Electrodo de trabajo.	13
3.2.4. Electrodo de referencia.	13
3.3. Preparación de la lengua electrónica y las muestras a medir.	14
3.4. Realización de las medidas.	15
3.4.1. Potenciometría.....	15

3.4.2.	Voltametría cíclica.	15
3.4.3.	Voltametría de pulsos.	17
3.4.4.	Métodos de análisis multivariante.....	18
A.	Análisis de Componentes Principales (PCA).....	18
B.	Regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS), para predecir Y en función de X.....	19
4.	RESULTADOS	21
4.1.	Aplicación de la técnica electroquímica de potenciometría para la detección de adulteración en mieles.	21
4.2.	Aplicación de la técnica electroquímica de voltametría cíclica para la detección de adulteración en mieles.	23
4.3.	Aplicación de la técnica electroquímica de voltametría de pulsos para la detección de adulteración en mieles.	27
4.4.	Obtención de modelos de predicción para cuantificar concentraciones de jarabe adulterante.	31
5.	CONCLUSIONES	35
6.	BIBLIOGRAFÍA	37

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Pintura rupestre pintada en una roca en la Cova de l'Aranya (Bicorp), de un hombre prehistórico recolectando miel (Bogdanov, 2014).....	1
Figura 1.2. Configuración espacial de la glucosa, fructosa y sacarosa (Bogdanov, 2014).	2
Figura 1.3. Esquema de los componentes que forman la lengua electrónica (Alcañiz, 2011).	6
Figura 1.4. Clasificación de las técnicas electroquímicas para el estudio de los sensores electroquímicos (Alcañiz, 2011).	7
Figura 3.1. Aspecto exterior del equipo electrónico de medida de la señal potenciométrica.	12
Figura 3.2. Aspecto exterior del equipo electrónico de medida de la señal voltamétrica.	12
Figura 3.3. De la a) a la f) proceso de elaboración del montaje de los electrodos de trabajo de la lengua electrónica (Alcañiz, 2011)), y g) cilindro y electrodos de trabajo terminado.	13
Figura 3.4. Electrodo de referencia de calomelanos y sus componentes.....	13
Figura 3.5. Soporte plástico, con punta de algodón, que evita la contaminación del electrodo de referencia.....	14
Figura 3.6. Equipo voltamétrico conectado a los electrodos de trabajo y electrodo de referencia. Electrodos en el interior de la muestra realizando la medición de voltametría. Muestra termostatada a 25 °C. Temperatura controlada por una sonda.	15
Figura 3.7. Funcionamiento de la voltametría cíclica: a) Rampa de potencial aplicado tipo diente de sierra para los metales nobles, b) voltagrama de la intensidad de corriente generada frente al potencial aplicado.....	17
Figura 3.8. Potencial aplicado en el procedimiento de voltametría de pulsos.....	18
Figura 4.1. Potenciales (V) registrados con el equipo potenciométrico en las distintas muestras, para cada metal empleado (Ir, Rh, Pt, Au, Ag, Co, Cu y Ni).G+M (miel de girasol con jarabe de maíz), B+M (miel de brezo con jarabe de maíz), G+A (miel de girasol con jarabe de agave) y G+C (miel de girasol con jarabe de caña).	22
Figura 4.2. Voltagramas representando la intensidad de corriente generada por los metales nobles (Ir, Rh, Pt y Au) en función del potencial aplicado, con la técnica electroquímica voltametría cíclica, en la muestra G+M_10 (miel de girasol adulterada con jarabe de maíz al 10%).	24

Figura 4.3. Voltagramas representando la intensidad de corriente generada por los metales no nobles (Ag, Co, Cu y Ni) en función del potencial aplicado, con la técnica electroquímica voltametría cíclica, en la muestra G+M_10 (miel de girasol adulterada con jarabe de maíz al 10%).	24
Figura 4.4. Voltagramas superpuestos de las muestras G+A_0 (miel de girasol adulterada al 0% con jarabe de agave) y G+A_60 (miel de girasol adulterada al 60% con jarabe de agave) representado la corriente generada por los electrodos Pt y Au frente al potencial aplicado.	25
Figura 4.5. Voltagramas superpuestos de las muestras G+A_0 (miel de girasol adulterada al 0% con jarabe de agave) y G+A_60 (miel de girasol adulterada al 60% con jarabe de agave) representado la corriente generada por los electrodos Pt y Au frente al potencial aplicado..	25
Figura 4.6. Gráficas de análisis PCA (Principal Component Analysis) de las muestras G+M (miel de girasol y jarabe de maíz), B+M (miel de brezo y jarabe de maíz) y G+A (miel de girasol + jarabe de agave) realizadas con los datos obtenidos por el método voltametría cíclica en el segundo barrido.	26
Figura 4.7. Gráficas de análisis G+C (miel de girasol + jarabe de caña) realizados con los datos obtenidos por el método voltametría cíclica en el segundo barrido.	27
Figura 4.8. Respuesta electroquímica de la muestra B+M_40 (miel de brezo adulterada con jarabe de maíz al 40%) obtenida por los sensores de metales nobles (Ir, Rh, Pt y Au) aplicando el método de voltametría de pulsos.	28
Figura 4.9. Respuesta electroquímica de la muestra B+M_40 (miel de brezo adulterada con jarabe de maíz al 40%) obtenida por los sensores de metales no nobles (Ag, Co, Cu y Ni) aplicando el método de voltametría de pulsos.	28
Figura 4.10. Respuestas electroquímicas de las muestras G+C_0 (miel de girasol adulterada con jarabe de caña al 0%), G+C_20 (miel de girasol adulterada al 20% con miel de caña y G+C_60 (miel de girasol adulterada con jarabe de caña al 60%) obtenida por los sensores de metales nobles (Ir y Rh) aplicando el método de voltametría de pulsos.	29
Figura 4.11. Respuestas electroquímicas de las muestras G+C_0 (miel de girasol adulterada con jarabe de caña al 0%), G+C_20 (miel de girasol adulterada al 20% con miel de caña y G+C_60 (miel de girasol adulterada con jarabe de caña al 60%) obtenida por los sensores de metales no nobles (Co y Cu) aplicando el método de voltametría de pulsos.	29
Figura 4.12. Gráficas de análisis PCA (Principal Component Analysis) de las muestras G+M (miel de girasol y jarabe de maíz), B+M (miel de brezo y jarabe de maíz) y G+A (miel de girasol + jarabe de agave) realizadas con los resultados obtenidos por el método voltametría de pulsos.	30
Figura 4.13. Gráfica de análisis PCA (Principal Component Analysis) de la muestra G+C (miel de girasol + jarabe de caña) realizada con los resultados obtenidos por voltametría de pulsos.	31

- Figura 4.14. Gráficas de observado frente a predicho de la validación de los modelos PLS de la concentración de jarabe adicionado de todas las muestras, G+M (miel de girasol y jarabe de maíz), B+M (miel de brezo y jarabe de maíz), G+A (miel de girasol + jarabe de agave) y G+C (miel de girasol + jarabe de caña) realizadas a partir de los datos obtenidos de la voltametría cíclica con todos los electrodos (Ir, Rh, Pt, Au, Ag, Co, Cu y Ni).33
- Figura 4.15. Gráficas de observado frente a predicho de la validación de los modelos PLS de la concentración de jarabe adicionado de todas las muestras, G+M (miel de girasol y jarabe de maíz), B+M (miel de brezo y jarabe de maíz), G+A (miel de girasol + jarabe de agave) y G+C (miel de girasol + jarabe de caña), realizadas a partir de los datos obtenidos de la voltametría de pulsos con todos los electrodos (Ir, Rh, Pt, Au, Ag, Co, Cu y Ni).34

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. Composición de la miel (Bogdanov, 2014).....	2
Tabla 1.2. Excepciones de mieles con más de un 5% de sacarosa (ESCUELA DE APICULTURA, 2015).	3
Tabla 3.1. Diseño experimental del porcentaje de jarabes incorporados a las mieles. G= miel de girasol; B= miel de brezo; M= jarabe de maíz; A= jarabe de agave; C= Jarabe de caña. Muestras= G+M (miel de girasol con jarabe de maíz), B+M (miel de brezo con jarabe de maíz), G+A (miel de girasol con jarabe de agave) y G+C (miel de girasol con jarabe de caña) a diferentes concentraciones de adulteración.....	11
Tabla 3.2. Escalas de corriente (μA) elegidas en las ventanas de valores electroquímicos para la realización de las medidas de voltametría cíclica de las muestras G+M (miel de girasol con jarabe de maíz), B+M (miel de brezo con jarabe de maíz), G+A (miel de girasol con jarabe de agave) y G+C (miel de girasol con jarabe de caña).	16
Tabla 3.3. Escalas de corriente (μA) elegidas en las ventanas de valores electroquímicos para la realización de las medidas de voltametría de pulsos de las muestras G+M (miel de girasol con jarabe de maíz), B+M (miel de brezo con jarabe de maíz), G+A (miel de girasol con jarabe de agave) y G+C (miel de girasol con jarabe de caña).....	17
Tabla 4.1. Valores promedio de potenciometría obtenidos de los últimos 5 minutos del ensayo sobre las muestras G+M (miel de girasol con jarabe de maíz), B+M (miel de brezo con jarabe de maíz), G+A (miel de girasol con jarabe de agave) y G+C (miel de girasol con jarabe de caña).....	21
Tabla 4.2. Resultados de la validación de los modelos PLS en el análisis de voltametría cíclica.	32
Tabla 4.3. Resumen de valores de PLS en el análisis de voltametría de pulsos.....	32

1. INTRODUCCIÓN.

1.1. La miel.

1.1.1. Definición e historia de la miel.

Según la “Norma de calidad relativa a la miel”, se entiende como miel *“la sustancia natural dulce producida por la abeja Apis mellifera a partir del néctar de plantas o de secreciones de partes vivas de plantas o de excreciones de insectos chupadores presentes en las partes vivas de plantas, que las abejas recolectan, transforman combinándolas con sustancias específicas propias, depositan, deshidratan, almacenan y dejan en colmenas para que madure”* (Directiva 2001/110; Real Decreto 1049/2003). Dicha norma de calidad incluye los requisitos de límites de determinados parámetros de calidad que debe cumplir cualquier tipo de miel para poder ser comercializada.

La miel ha sido aprovechada por muchas culturas desde hace miles de años como alimento, edulcorante, y con fines medicinales (Gómez-Caravaca *et al.*, 2006).

En Egipto, existen pinturas representando colmenas cilíndricas, apicultores utilizando ahumadores y realizando operaciones de extracción, filtración y envasado de la miel en vasijas, etcétera. En Grecia, la miel era un ingrediente imprescindible de toda casa bien dotada. En Roma, muchas de las recetas la utilizaban como ingrediente, al igual que en la cultura árabe, hegemónica en España desde el siglo VII al XIII, pues se usaba en numerosos platos, postres y bebidas, así como en sus afamadas preparaciones médicas.

En Valencia, en la Cova de l'Aranya (Bicorp), se encuentra el primer documento histórico de aprovechamiento de la miel por la Humanidad. Se trata de una pintura rupestre de hace unos 9000 años (Figura 1.1). Existen otras pinturas similares en la zona, así como representaciones de enjambres y abejas (ESCUELA DE APICULTURA, 2015).



Figura 1.1. Pintura rupestre pintada en una roca en la Cova de l'Aranya (Bicorp), de un hombre prehistórico recolectando miel (Bogdanov, 2014).

1.1.2. Composición de la miel.

La miel es una disolución sobresaturada de azúcares en agua (aproximadamente el 95% en peso seco son azúcares), pero además está formada por más de 181 componentes (Viuda Martos *et al.*, 2008).

La Figura 1.2 muestra la configuración espacial de molécula de glucosa, fructosa y sacarosa, azúcares mayoritarios de la miel. El néctar y las secreciones de las plantas que liban las abejas

son ricos especialmente en sacarosa. Cuando la abeja recolecta estas sustancias, pasan al buche, y se mezclan con secreciones de sus glándulas salivares cefálicas y torácicas, que aportan enzimas, y hacen que la sacarosa se rompa en sus dos componentes, fructosa y glucosa, monosacáridos formados por un anillo de 6 átomos de carbono. Al tratarse de azúcares simples, son fácilmente digeribles.

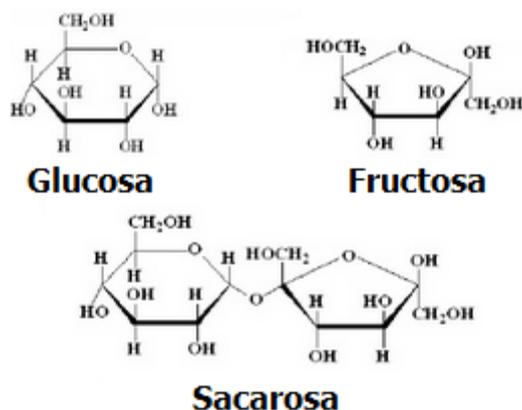


Figura 1.2. Configuración espacial de la glucosa, fructosa y sacarosa (Bogdanov, 2014).

Dependiendo de si la miel procede del néctar de las flores (miel de flores) o de las secreciones de las plantas (miel de mielada), su composición es muy diferente. Las mieles de flores deben tener un mínimo de 60 % de fructosa más glucosa. Las mieles de mielada, tienen porcentajes menores, el límite legal está en mínimo 45% (Real Decreto 1049/2003). Además, al ser un producto natural, su composición sufre fluctuaciones en función de su origen botánico y geográfico, y de las condiciones climatológicas (Juan-Borrás, 2015). En la Tabla 1.1 se muestra la composición aproximada de la miel, haciendo diferenciación entre miel de flores y miel de mielada:

Tabla 1.1. Composición de la miel (Bogdanov, 2014).

	Miel de flores		Miel de mielada	
	Valor medio	Mín - Máx	Valor medio	Mín - Máx
Humedad (g/100 g)	17.2	15 – 20	16.3	15 – 20
Azúcares totales (g/100 g)	79.7	–	80.5	–
Fructosa (g/100 g)	38.2	30 – 45	31.8	28 – 40
Glucosa (g/100 g)	31.3	24 – 40	26.1	19 – 32
Sacarosa (g/100 g)	0.7	0.1 – 4.8	0.5	0.1 – 4.7
Otros disacáridos (g/100 g)	5	28	4	16
Melecitosa (g/100 g)	<0.1	–	4	0.3 – 22
Erlosa (g/100 g)	0.8	0.56	1	0.16
Otros oligosacáridos (g/100 g)	3.6	0.5 – 1	13.1	0.1 – 6
Minerales (g/100 g)	0.2	0.1 – 0.5	0.9	0.6 – 2
Aminoácidos, proteínas (g/100 g)	0.3	0.2 – 0.4	0.6	0.4 – 0.7
Ácidos (g/100 g)	0.5	0.2 – 0.8	1.1	0.8 – 1.5
pH	3.9	3.5 – 4.5	5.2	4.5 – 6.5

Aparte de los ya mencionados, existen diferencias entre otros sacáridos presentes en la miel de flores y la miel de mielada. La primera contiene disacáridos como la maltosa y la turanosa, y oligosacáridos como la erlosa. La miel de mielada contiene, además, los trisacáridos melecitosa y rafinosa. También se han aislado trazas de tetra y pentasacáridos en algunos tipos de miel. La

composición de azúcares puede ser determinada por diferentes métodos cromatográficos, siendo el HPLC el más utilizado (Bogdanov, 2014).

La sacarosa es el tercer azúcar incluido en la “Norma de calidad de miel”. Legalmente, en la miel se permite hasta un 5% de contenido en sacarosa (R.D. 1049/2003), aunque existen excepciones para algunos tipos (Tabla 1.2).

Tabla 1.2. Excepciones de mieles con más de un 5% de sacarosa (ESCUELA DE APICULTURA, 2015).

Hasta el 10%	Hasta el 15%
Falsa acacia (<i>Robinia pseudoacacia</i>)	Espliegos (<i>Lavandula vera</i> , <i>L. latifolia</i> , <i>L.spp</i>)
Alfalfa (<i>Medicago sativa</i>)	Lavandines (híbridos comerciales de lavandas)
Banksias (mieles australianas que se venden en Europa)	Borraja (<i>Borago officinalis</i>)
Zulla (<i>Hedysarum spp</i>)	
Eucalipto negro o de verano (<i>Eucalyptus camaldulensis</i>)	
<i>Eucryphia</i> (otra miel de importación)	
Mieles de azahar (<i>Citrus spp</i>)	

Varios estudios atribuyen a la miel pura de abeja propiedades tales como: poder antioxidante (Gheldof *et al.*, 2002; Escriche *et al.*, 2011) por la presencia de compuestos fenólicos y flavonoides (Osztmianski & Lee, 1990; Yao *et al.*, 2003; Aljadi & Kamaruddin, 2004; Laslo & Marghitas, 2004 e Escriche *et al.*, 2011), capacidad anti-inflamatoria (Ali *et al.*, 1991), poder antivírico, inhibición del pardeamiento enzimático de frutas y verduras por la presencia de ácido ascórbico, péptidos, flavonoides, α -tocoferol y enzimas como glucosa oxidasa, catalasa, y peroxidasa (Osztmianski & Lee, 1990) y acción antibacteriana por la presencia de azúcares y su efecto osmótico (Molan, 1992), entre otras.

1.2. Adulteración de mieles.

Según el Código Alimentario Español, se considera alimento adulterado a “todo alimento al que se haya adicionado o sustraído cualquier sustancia para variar su composición, peso o volumen, con fines fraudulentos o para encubrir o corregir cualquier defecto debido a ser de inferior calidad o a tener ésta alterada” (Decreto 2484/1967). Cuando un alimento contiene un ingrediente que no está identificado en la etiqueta, legalmente se considera adulterado.

La adulteración es un tema importante para los consumidores, puesto que pagan por un producto no auténtico, para la industria, pues aparece la competencia desleal, y para la Administración Pública, se trata de un problema de fraude.

Entre los productos alimentarios diana para ser adulterados se encuentra la miel (Cordella *et al.*, 2002). Se trata de un edulcorante de alto valor comercial, con un amplio rango de usos en la industria alimentaria. Tiene un alto valor nutricional, un sabor único y un precio superior al de otros edulcorantes como puede ser el azúcar de caña o jarabe de maíz (Qiu P. *et al.*, 1999), ya que su producción también es más costosa.

La aparición de azúcares exógenos en la miel puede producirse por dos motivos principalmente: (1) por la adición de jarabes de azúcar a la miel pura, o (2) por alimentar con

azúcar a las abejas durante el flujo del néctar. Ambas vías producen un aumento de la producción y, por lo tanto, un incremento de los beneficios económicos. Sin embargo, este producto no puede considerarse como miel pura, ya que no cumple con los parámetros exigidos para considerarse como tal. A este producto se le denomina “miel adulterada”. También existe otro tipo de adulteración de miel, que consiste en la adición de mieles de peor calidad y menor coste a mieles de mayor calidad y coste (Wang *et al.*, 2014). Si dicha mezcla no es debidamente etiquetada, haciéndola pasar por miel pura de alta calidad, se considera fraude.

En las últimas décadas, la detección de adulteración en miel ha sido el objetivo de muchos estudios (Wang *et al.*, 2014). Como anteriormente se ha comentado, una de las principales causas de adulteración de mieles es la adición de jarabes o siropes, por este motivo, las investigaciones se están centrando mayoritariamente en la detección y cuantificación de azúcares ajenos a la miel.

Diversas técnicas analíticas han sido utilizadas con el fin de controlar la autenticidad de la miel: GC/MS (cromatografía gaseosa/espectroscopía de masas) (Padovan *et al.*, 2003) y EA-IRMS (analizador elemental - espectroscopía de masas de relación isotópica) (Simsek *et al.*, 2012) a través de la relación isotópica del $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$; LC-ECD (cromatografía líquida con detección electroquímica), FTIR-ATR (Transformada de Fourier de la Radiación Infrarroja – Reflectancia atenuada Total) (Sivakesava & Irudayaraj, 2001) para la detección y cuantificación de jarabe de maíz añadido, HR-NMR (alta resolución – Resonancia magnética nuclear) para la detección de mieles adulteradas con jarabes de azúcar (Bertelli *et al.*, 2010), para la detección de mezclas de miel de acacia con miel de colza (Wang *et al.*, 2014), entre otros muchos estudios.

Entre las técnicas más novedosas utilizadas en las últimas décadas en el campo agroalimentario se encuentra el dispositivo de “lengua electrónica”. Esta técnica multisensor ha sido aplicada para la detección de adulteraciones: leche de oveja con leche de vaca (Dias *et al.* 2009), vino con sustancias químicas prohibidas para mejorar su calidad organoléptica (Parra *et al.*), zumos con agua y azúcares añadidos (Rudnitkaya, 2001), entre otros. Además, ha sido también empleada para la clasificación de mieles en función de su origen botánico (Días *et al.*, 2008; Wie *et al.* 2009; Escriche *et al.* 2012). Puesto que los resultados obtenidos en ambos tipos de investigaciones han sido satisfactorios, se plantea la posibilidad de utilizar esta técnica (la lengua electrónica) para la detección de adulteración de mieles con jarabes.

1.3. Lengua electrónica.

La lengua electrónica se presenta como un equipo de medida rápido, de bajo coste, de baja selectividad y de sensibilidad cruzada para el análisis de líquidos (García-Breijo, 2005). Ha sido aplicada para análisis de control de calidad de: aguas minerales (Martínez-Máñez *et al.*, 2005), (Zhuiykov, 2012), vinos (Campos *et al.*, 2013), leche (Dias *et al.* 2009), miel (Dias *et al.*, 2008), etcétera.

Las investigaciones realizadas en el campo de las lenguas electrónicas se pueden agrupar en 2 tendencias: (1) las que pretenden imitar el sentido del gusto y cuyo objetivo es clasificar el alimento por su sabor concreto a partir de la determinación de los 5 sabores básicos (dulce, salado, ácido, amargo y umami). Este tipo de investigación se le denomina “sensores del sabor”, y (2) las que pretenden clasificar distintas muestras con una matriz común o cuantificar en función de alguno de sus componentes, sin tener en cuenta los sabores como tal, a partir

de la información tomada por los sensores, se le denomina “lengua electrónica” (García-Breijo, 2005).

De acuerdo con la reciente definición de la IUPAC4, una lengua electrónica es "*un sistema multisensor, que consiste en un conjunto de sensores que poseen una baja selectividad y que utilizan unos procedimientos matemáticos avanzados para el procesamiento de las señales obtenidas. Estos procedimientos matemáticos están basados en la formación de Patrones de Reconocimiento y/o Análisis de Datos Multivariados, como son las Redes Neuronales Artificiales (RNA), los Análisis por Componentes Principales (PCA), etcétera*"(Campos, 2013).

Dicho de manera más sencilla, se entiende como lengua electrónica a un sensor para análisis de líquidos, que consigue determinar parámetros físico-químicos de matrices complejas, reproduciendo de manera artificial el sentido del gusto (Jiménez *et al.* 2002).

Tal y como menciona Labrador (2009) en su tesis doctoral "*el diseño y construcción de lenguas electrónicas requiere de la fusión de varias ramas de la ciencia, como son la tecnología de los sensores, metodología de los patrones de reconocimiento, inteligencia artificial y herramientas quimiométricas*".

1.3.1. Componentes de la lengua electrónica.

La lengua electrónica consta de: un conjunto de sensores de distinto especificidad, una instrumentación para adquirir la señal y un sistema de procesado de datos (ver Figura 1.3) (Jiménez *et al.* 2002).

A. Sensores.

Se conoce como sensor al dispositivo capaz de transformar información física o química de su entorno en una señal útil, que pueda ser posteriormente transformada.

En el caso de la lengua electrónica, se trabaja con sensores electroquímicos. Los sensores electroquímicos transforman el efecto de la interacción electroquímica analito-electrodo en una señal; el efecto puede ser estimulado eléctricamente o resultado de una interacción espontánea (corriente 0) (García-Breijo, 2005).

El sensor ideal es aquel que reúne las siguientes cualidades: bajo coste, fácil construcción, robustez, portabilidad y fácil de utilizar.

Los sensores que forman la lengua electrónica tienen una baja selectividad (semi-específicos) y sensibilidad cruzada. Son sensores no diseñados para detectar una especie concreta. Esta característica permite medir muestras en las que existen interferencias entre los compuestos que las forman. El número de sensores depende de la aplicación y de la técnica empleada. (Jiménez *et al.*, 2002; Alcañiz, 2011). Estos sensores actúan como electrodos de trabajo o indicador, electrodo en el que se centra el estudio.

Una de las grandes ventajas del uso de la lengua electrónica como equipo de medida de líquidos, además de las ya nombradas, es que al basarse en electrodos metálicos es muy sencilla la prevención de problemas por ensuciamiento, ya que se puede evitar con un pulido de los electrodos. (Campos *et al.* 2012).

Cabe destacar, por su papel fundamental, al electrodo de referencia. Es un electrodo no polarizable, que debe mantener su potencial estable ante cambios en la concentración del

soluto en la disolución y, por tanto, da una referencia a la medida del electrodo de trabajo (García-Breijo, 2005; Campos, 2013). No se debe producir circulación de corriente por el electrodo de referencia (Alcañiz, 2011).

Existen varios tipos de electrodos de referencia (electrodos estándar de hidrogeno, electrodos de referencia de plata/cloruro de plata, electrodos de referencia de calomelanos, etcétera) (Alcañiz, 2011).

Tal y como indica García-Breijo (2005) en su tesis doctoral, este electrodo consta de un conductor metálico que se encuentra en contacto con una sal poco soluble y una disolución de alta concentración y composición constante, a la que se denomina electrolito de referencia.

El electrolito de referencia y la disolución problema contactan a través del diafragma del electrodo (una pared porosa). Esta unión líquida permite un flujo del electrolito hacia la disolución. Por diferencia de movilidad entre los aniones y cationes del electrolito, se crea un potencial en dicha unión líquida. Este potencial va a depender de la composición, la concentración y la temperatura del electrolito de referencia. Para conseguir que sea lo más pequeño y constante posible, habrá que tener en cuenta lo siguiente:

- Seleccionar electrolitos de referencia con movilidad parecida: ejemplo KCl.
- La concentración del electrolito de referencia será de 5 a 10 veces superior a la esperada en las muestras.
- La velocidad de agitación debe mantenerse constante en las medidas.
- El diafragma debe ser adecuado al tipo de análisis.

B. Instrumento para adquirir la señal (Sistema de medida).

Se encarga de captar las señales eléctricas generadas por los sensores, y, posteriormente, digitalizarlas y enviarlas al sistema de procesado de datos. Las señales eléctricas pueden ser el potencial de la interfaz electrodo-muestra o la corriente generada como respuesta a la aplicación de un determinado potencial al electrodo.

C. Software (Sistema de procesado de datos).

Mediante el software creado con los algoritmos apropiados, se pueden procesar las señales obtenidas por el sistema de medida. (Jiménez *et al.* 2002).

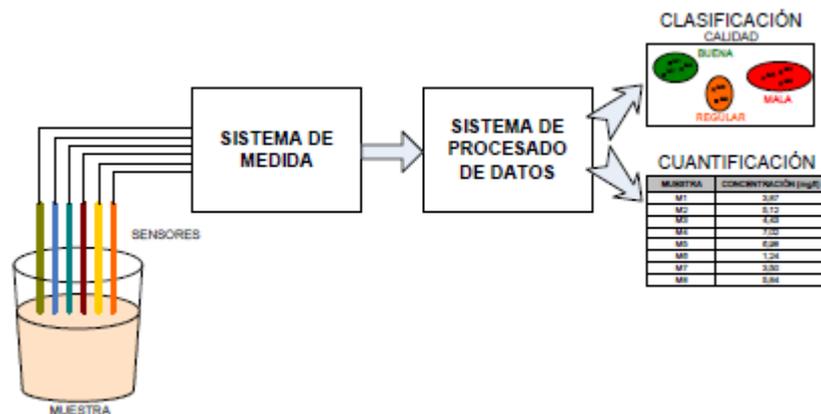


Figura 1.3. Esquema de los componentes que forman la lengua electrónica (Alcañiz, 2011).

1.3.2. Funcionamiento de la lengua electrónica.

La baja selectividad de los sensores es perfectamente compatible con su función de clasificación (Gutés *et al.*, 2007). También se puede utilizar para cuantificar, puesto que como explica Vlasov *et al.* (2008), cuando en una disolución existen varios compuestos que pueden reaccionar entre sí, la cuantificación de uno de ellos mediante sensores selectivos puede complicarse. En cambio, con el uso de sensores no selectivos (cada uno de ellos dará una respuesta diferente), y herramientas de análisis multivariante, se pueden obtener modelos de predicción que nos permitan cuantificar las especies en concreto.

Para la obtención de resultados con la lengua electrónica, previamente se debe realizar un entrenamiento a través de reconocimiento de patrones, es decir, exponer al equipo a muestras de características conocidas (con concentraciones de analito conocidas en la misma matriz que la muestra problema), para que se establezcan respuestas patrón, que se almacenan en una base de datos. Con esto se podrán crear modelos de clasificación o cuantificar algún parámetro físico-químico (Alcañiz, 2011).

Las técnicas electroquímicas pueden clasificarse tal y como se indica la Figura 1.4:

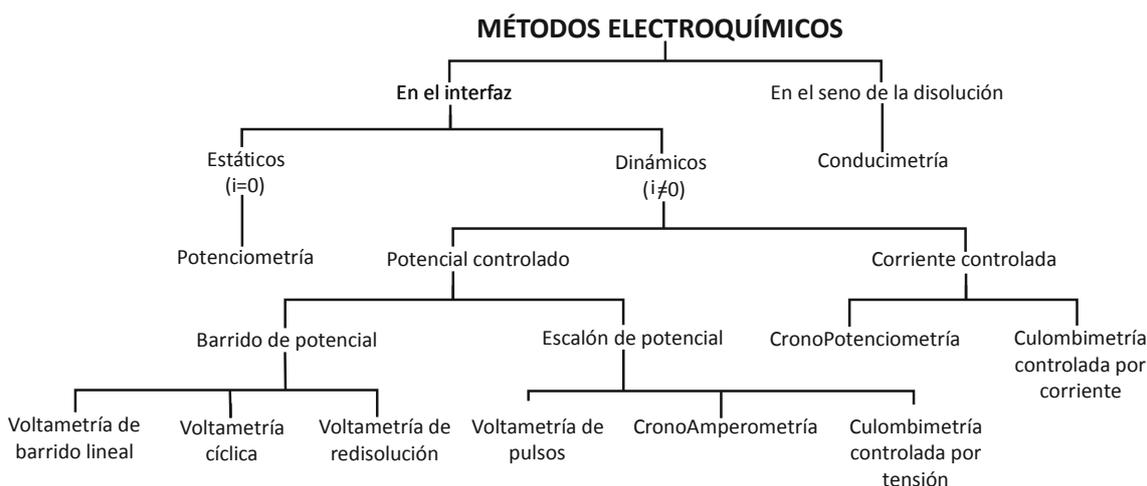


Figura 1.4. Clasificación de las técnicas electroquímicas para el estudio de los sensores electroquímicos (Alcañiz, 2011).

Dos de las técnicas electroquímicas más empleadas en el campo de la lengua electrónica son la potenciometría y la voltametría (tanto la cíclica como la de pulsos).

A. Potenciometría

La potenciometría es una técnica sencilla, basada en la medición del potencial entre dos electrodos (electrodo de trabajo y electrodo de referencia) sin aplicación de flujo de corriente (corriente nula), por lo que el circuito electrónico se simplifica. Tienen como objetivo conseguir información sobre la composición de la muestra analizada. Como el electrodo de referencia es muy estable, cualquier cambio de potencial será debido a la contribución del electrodo de trabajo exclusivamente (Alcañiz, 2011).

Al sumergir el electrodo de referencia y el de trabajo en la disolución problema, se establece un flujo de iones en la interfase sensor-disolución. Se produce entonces una diferencia de

potencial, cuya magnitud va a variar dependiendo de la cantidad de analito detectado por sensor utilizado (García-Breijo, 2005)

B. Voltametría.

Las técnicas voltamétricas implican la aplicación de un potencial controlado a la interfaz del electrodo de trabajo y medición de la corriente resultante, que se obtiene cuando las especies redox activas se reducen o se oxidan. Este potencial puede aplicarse como barrido de potencial (voltametría cíclica) o como escalones de potencial (voltametría de pulsos). Aunque es menos sencilla que la potenciometría, la voltametría aporta más versatilidad y robustez en los análisis, ya que no se ven influenciados por perturbaciones eléctricas (García-Breijo, 2005; Campos, 2013). Para este método, es necesario trabajar a tres electrodos: (1) electrodo de trabajo: se le aplica un potencial determinado y se mide la corriente que circula. En él se producen los procesos electroquímicos a medir, (2) contraelectrodo: encargado de cerrar el circuito y permitir el paso de corriente hacia el electrodo de trabajo. En él también se pueden producir procesos electroquímicos que cambian la medida, y pueden hacer imposible controlar el potencial aplicado por lo que se requiere de un tercer elemento, y (3) electrodo de referencia: Por él no puede pasar corriente y debe permanecer estable ante cambios en la disolución (Alcañiz, 2011).

2. OBJETIVOS.

2.1. Objetivo principal.

El objetivo principal del presente estudio ha sido evaluar la efectividad de un sistema de lengua electrónica basado en tres técnicas electroquímicas con sensores metálicos, para la identificación de la adición de jarabes a la miel.

2.2. Objetivos específicos.

1. Evaluar la efectividad de la aplicación de la técnica electroquímica de potenciometría
2. Evaluar la efectividad de la aplicación de la técnica electroquímica de voltametría cíclica.
3. Evaluar la efectividad de la aplicación de la técnica electroquímica de voltametría de pulsos.
4. Obtener modelos de predicción para cuantificar concentraciones de jarabe adulterante.

3. MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1. Materia prima y preparación del diseño experimental.

Para la preparación de las muestras se utilizó miel cruda de girasol (*Helianthus annuus*) de origen español (Ref. REINV4714 Laboratorio de la miel), miel cruda de brezo (*Calluna vulgaris*) de origen español (Ref. REINV34914 Laboratorio de la miel), jarabe de glucosa y fructosa de maíz marca ROQUETE, Laisa España S.A., (Ref. 7081 Laboratorio de la miel), sirope de Agave marca SUNNY VIA (Ref. REINV6414. Laboratorio miel) y jarabe de caña y acidulante (0.32%), “miel de caña” marca INGENIO NUESTRA SEÑORA DEL CARMEN (Ref. REINV6614 Laboratorio de la miel).

La Tabla 3.1 muestra el diseño de experimentos planteado en el presente trabajo. En ella se detallan los porcentajes de jarabe adicionado a las mieles. En el estudio se han considerado 2 tipos de miel cruda, 6 niveles de adulteración y 3 tipos de jarabe. Las diferentes muestras objeto de análisis se obtenían mezclando la cantidad correspondiente de miel y jarabe. La homogenización se conseguía agitando la mezcla manualmente por espacio de 10 minutos. Con anterioridad a la preparación de las disoluciones con agua que eran medidas por el dispositivo de lengua electrónica, las muestras se agitaban 2 minutos más, para garantizar su total homogeneidad.

Tabla 3.1. Diseño experimental del porcentaje de jarabes incorporados a las mieles. G= miel de girasol; B= miel de brezo; M= jarabe de maíz; A= jarabe de agave; C= Jarabe de caña. Muestras= G+M (miel de girasol con jarabe de maíz), B+M (miel de brezo con jarabe de maíz), G+A (miel de girasol con jarabe de agave) y G+C (miel de girasol con jarabe de caña) a diferentes concentraciones de adulteración.

G+M		
Código muestra	miel girasol (G) g /100 g	jarabe de maíz (M) g/100 g
G+M_(0)	100	0
G+M_(5)	95	5
G+M_(10)	90	10
G+M_(20)	80	20
G+M_(40)	60	40
G+M_(60)	40	60

B+M		
Código muestra	miel brezo (B) g /100 g	jarabe de maíz (M) g/100 g
B+M_(0)	100	0
B+M_(5)	95	5
B+M_(10)	90	10
B+M_(20)	80	20
B+M_(40)	60	40

G+A		
Código muestra	miel girasol (G) g /100 g	jarabe de agave (A) g/100 g
G+A_(0)	100	0
G+A_(5)	95	5
G+A_(10)	90	10
G+A_(20)	80	20
G+A_(40)	60	40
G+A_(60)	40	60

G+C		
Código muestra	miel girasol (G) g /100 g	jarabe de caña (C) g/100 g
G+C_(0)	100	0
G+C_(5)	95	5
G+C_(10)	90	10
G+C_(20)	80	20
G+C_(40)	60	40
G+C_(60)	40	60

3.2. Dispositivo de lengua electrónica.

El sistema de lengua electrónica utilizado en el presente trabajo fue desarrollado por el Centro de Reconocimiento Molecular y Desarrollo Tecnológico (IDM) de la Universidad Politécnica de Valencia (UPV). Dicho dispositivo consta de:

- (1) Equipo de medida de potenciometría (Gil, 2007)
- (2) Equipo de medida de voltimetría FraPlusMini (Alcañiz, 2011),
- (3) Electrodo: 8 electrodos de trabajo y un electrodo de referencia.
- (4) Software para el análisis multivariante de los datos potenciométricos y voltamétricos.

3.2.1. Equipo de medida de potenciometría.

En la Figura 3.1 puede apreciarse el aspecto exterior del equipo electrónico de potenciometría. En la parte superior tiene un conector para el electrodo de referencia y hasta 12 posibles conectores para electrodos de trabajo. En el presente estudio se ocuparon 8 de los 12 conectores para los 8 electrodos de trabajo empleados (Ir, Rh, Pt, Au, Ag, Co, Cu y Ni).

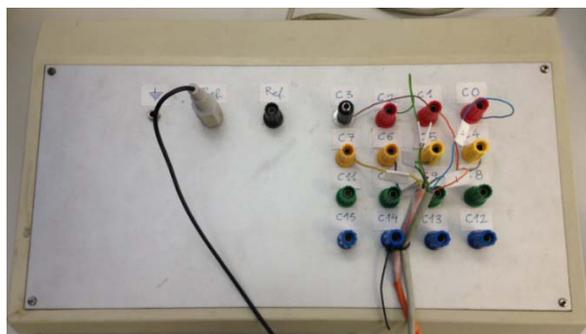


Figura 3.1. Aspecto exterior del equipo electrónico de medida de la señal potenciométrica.

3.2.2. Equipo de medida de voltimetría FraPlusMini.

En la Figura 3.2 puede apreciarse el aspecto exterior del equipo electrónico de medida de la señal eléctrica de voltimetría. Dispone en la parte frontal de un conector para el electrodo de referencia y otro dos para los electrodos de trabajo.



Figura 3.2. Aspecto exterior del equipo electrónico de medida de la señal voltamétrica .

3.2.3. Electrodo de trabajo.

En el presente estudio se han empleado 8 electrodos de trabajo: 4 metales nobles (Ir, Rh, Pt y Au) y 4 metales no nobles (Ag, Co, Cu y Ni). Estos tenían una longitud de 2.5 cm, 1 mm de diámetro y una pureza del 99.9%. Los electrodos se agruparon en dos cilindros metálicos de acero inoxidable de unos 10 cm de longitud. Los cilindros de acero, además de actuar como soporte de los 4 electrodos, actúan de contraelectrodo. Los electrodos se encontraban encapsulados en una resina epoxi en el interior del cilindro de acero (ver figura 3.3). Con la utilización de electrodos de metales tanto nobles como no nobles se consigue un comportamiento electroquímico más variado (Campos, 2013).

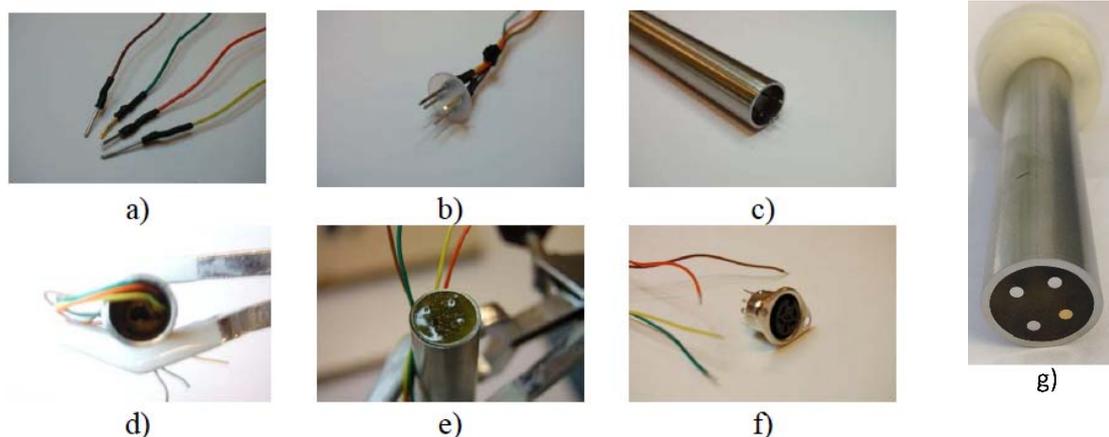


Figura 3.3. De la a) a la f) proceso de elaboración del montaje de los electrodos de trabajo de la lengua electrónica (Alcañiz, 2011)), y g) cilindro y electrodos de trabajo terminado.

3.2.4. Electrodo de referencia.

En el presente trabajo se utilizaba como referencia un electrodo de calomelanos, Figura 3.4, formado por un tubo de vidrio que contenía una mezcla de Hg, Hg_2Cl_2 y KCl saturada. Este tubo, a su vez, estaba rodeado de otro tubo que contenía una disolución de KCl saturada. El tubo interior contaba con un pequeño orificio en su base que lo comunicaba con el contenido del tubo periférico. La punta de este electrodo, de vidrio poroso, funciona como puente salino. El potencial del electrodo de referencia se mantiene estable con una temperatura de 25 ° C (aproximadamente) en la disolución. La estabilidad del potencial es fundamental para garantizar la calidad de la medida ante cambios en la concentración de la disolución

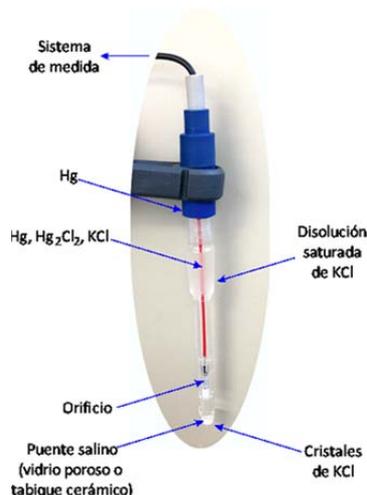


Figura 3.4. Electrodo de referencia de calomelanos y sus componentes.

3.3. Preparación de la lengua electrónica y de las muestras a medir.

Para la realización de los ensayos con este dispositivo era necesario la preparación previa de sus elementos y de la muestra a tratar, tal y como se indica a continuación:

- A. *Acondicionamiento del electrodo de referencia de calomelanos:* al comienzo de cada día de trabajo se tomaba el electrodo de referencia, que debía encontrarse almacenado en un recipiente con una disolución saturada de KCl (para evitar su descarga por diferencia de concentración). Se comprobaba que la disolución interna se encontraba en estado saturado. En caso de no ser así, se adicionaba KCl hasta su saturación. Para evitar la contaminación del electrolito (por entrada de la disolución problema en el interior del electrodo, debido a la porosidad de la barrera y la gran diferencia de composición), se interponía una barrera con una disolución de KCl 0.1 M. Esta barrera se realizaba con un soporte de plástico que encajaba con el electrodo y que en su extremo contenía un trozo de algodón empapado de la disolución de KCl 0.1M, tal y como se observa en la Figura 3.5 en contacto con la muestra.



Figura 3.5. Soporte plástico, con punta de algodón, que evita la contaminación del electrodo de referencia.

- B. *Acondicionamiento de los electrodos de trabajo:* antes de cada medición, la superficie de los electrodos fue preparada por pulido mecánico. Este es un punto crítico dentro del proceso de medida, ya que sobre la superficie de los electrodos de trabajo se producen fenómenos de corrosión del metal, fisiorción, quimisorción, etcétera, que generan en el electrodo una capa residual que provoca la distorsión de la medida (Rivera, 2012). Para evitar esto, se enjuagaban los electrodos con agua destilada y se pulían, primero con un papel de lija de grano 1200 humedecido y segundo con un papel de lija humedecido de grano 4000. El pulido debía ser homogéneo, se realizaban pequeños movimientos circulares (entre 40 y 60 repeticiones), intentando mantener la presión sobre el cilindro y manteniendo asimismo el sentido de giro. Se aclaraban con agua destilada para eliminar las impurezas y se secaban para no contaminar la muestra.
- C. *Ubicación de los electrodos:* una vez estaban preparados todos los electrodos, se conectaban a la clavija correspondiente y se colocaban en el orificio del soporte correspondiente, tal y como se indica en la Figura 3.6.
- D. *Preparación de las muestras a medir:* Debido a la alta viscosidad de la miel y los jarabes, los sensores no eran capaces de realizar las mediciones sobre las muestras tal cual se encontraban. Por esta razón, se disolvían 10 g de muestra en 50 g de agua destilada en un vaso de muestreo. El vaso de muestreo se introducía en un baño de

agua para atemperar la muestra y llevarla a temperatura de 25°C, dejándola en agitación durante 5 minutos.

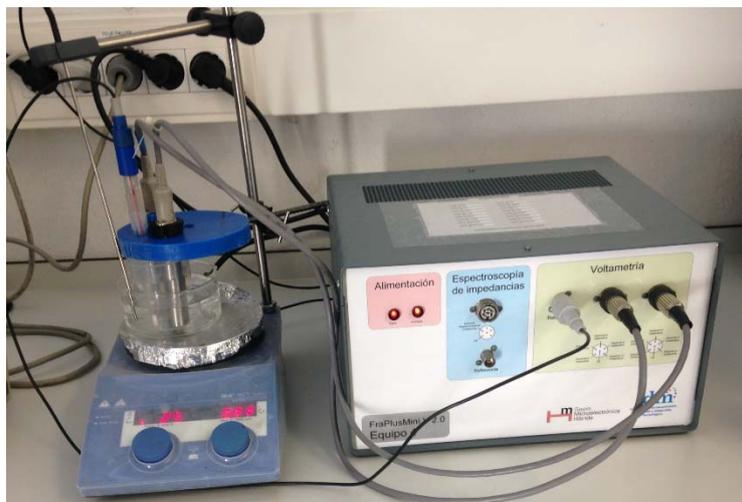


Figura 3.6. Equipo voltamétrico conectado a los electrodos de trabajo y electrodo de referencia. Electrodo en el interior de la muestra realizando la medición de voltametría. Muestra termostatada a 25 °C. Temperatura controlada por una sonda.

3.4. Realización de las medidas.

En cada muestra se realizaban ensayos de potenciometría, voltametría cíclica y voltametría de pulsos. Se comenzaba haciendo la medida potenciométrica, posteriormente se cambiaban las clavijas del equipo (de potenciometría a voltametría) y se realizaba la medida de voltametría cíclicas sin sacar los electrodos de la muestras para no perder la estabilización. Tras un nuevo acondicionamiento de los electrodos de trabajo, tal y como se ha explicado en el apartado 3.3., se volvía a medir nuevamente sobre la misma muestra la potenciometría. Posteriormente se volvían a cambiar las clavijas del equipo de potenciometría a voltametría y se realizaba la medida de voltametría de pulsos sin extraer los electrodos de trabajo. La explicación más detallada se muestra en los siguientes apartados.

3.4.1. Potenciometría.

Se colocaban las clavijas de los electrodos en los conectores correspondientes al equipo potenciométrico y se procedía a la medida del potencial. La señal generada era registrada cada 10 s durante 15 minutos con la muestra problema a 25°C y en agitación a 450 rpm. La potenciometría necesita un tiempo de estabilización del sensor con el analito para dar potenciales estables. Por esta razón, para el tratamiento de los datos, solo se tuvieron en cuenta los últimos 5 minutos de señales registradas (si estos eran estables).

3.4.2. Voltametría cíclica.

Sin separar los electrodos de la disolución, se extraía el imán para evitar posibles interferencias en la medida de la voltametría. Para poder realizar esto, se perforó la placa de sujeción de los electrodos. Se cambiaban las clavijas de los sensores a los conectores correspondientes al equipo de medida de voltametría. Las ventanas de valores electroquímicos para la realización de las medidas fueron configuradas de la siguiente manera:

- Pendiente: 100 mV/s.
- Origen: 0 mV/s.
- Aplicación de tensión: (1) para los metales nobles (Ir, Rh, Pt y Au) → rango de potenciales desde 1000 mV hasta -1000 mV a velocidad de barrido de 100 mV·s⁻¹ (2) para los metales no nobles (Ag, Co, Cu y Ni) → rango de potenciales desde 1000 mV hasta -500 mV a velocidad de barrido de 100 mV·s⁻¹. Para los metales no nobles la ventana se debe reducir debido a los procesos de corrosión que sufren estos metales cuando se someten a potenciales de oxidación elevados (Campos, 2013).
- Escala de corriente (μA): Se ajustaba para cada electrodo, ya que cada uno genera una intensidad de corriente. Para conocer en que intervalo se debía trabajar, se realizó una ronda de prueba, y se estableció que escala era más idónea para cada muestra y cada electrodo. Se indica a continuación en la Tabla 3.2 las escalas de corriente con las que se trabajaba para cada muestra.
- Las medidas de voltametría de pulsos se realizan a tres electrodos: (1) electrodo de trabajo, (2) contraelectrodo y (3) electrodo de referencia.

Tabla 3.2. Escalas de corriente (μA) elegidas en las ventanas de valores electroquímicos para la realización de las medidas de voltametría cíclica de las muestras G+M (miel de girasol con jarabe de maíz), B+M (miel de brezo con jarabe de maíz), G+A (miel de girasol con jarabe de agave) y G+C (miel de girasol con jarabe de caña).

G+M							B+M					
Electrodos	Jarabe de maíz g/100 g						Electrodos	Jarabe de maíz g/100 g				
	0	5	10	20	40	60		0	5	10	20	40
Ir	12	12	12	12	12	12	Ir	28	20	20	18	18
Rh	12	12	12	12	12	12	Rh	28	20	20	18	18
Pt	12	12	12	12	12	12	Pt	28	20	20	18	18
Au	12	12	12	12	12	12	Au	14	14	12	12	12
Ag	12	12	12	12	12	12	Ag	20	14	14	14	12
Co	12	12	12	12	12	12	Co	166	166	166	166	116
Cu	70	70	60	60	60	39	Cu	28	20	20	18	18
Ni	39	28	28	28	28	14	Ni	14	14	12	12	12

G+A							B+C						
Electrodos	Jarabe de agave g/100 g						Electrodos	Jarabe de caña g/100 g					
	0	5	10	20	40	60		0	5	10	20	40	60
Ir	12	12	12	12	12	12	Ir	12	16	16	20	28	39
Rh	12	12	12	12	12	12	Rh	12	16	16	20	28	39
Pt	12	12	12	12	12	12	Pt	12	16	16	20	28	39
Au	12	12	12	12	12	12	Au	12	12	12	12	12	12
Ag	12	12	12	12	12	12	Ag	12	12	14	16	28	39
Co	66	66	54	54	45	35	Co	70	90	90	166	246	327
Cu	39	39	28	28	14	14	Cu	39	39	39	66	116	178
Ni	12	12	12	12	12	12	Ni	12	14	14	14	14	14

La rampa de potencial aplicado en la técnica de voltametría cíclica fue del tipo diente de sierra, el potencial aplicado se aumenta de manera lineal y, una vez alcanzado el potencial máximo, se realiza un nuevo barrido en sentido contrario hasta alcanzar el valor inicial (Alcañiz, 2011) como se muestra en la Figura 3.7.a. En este estudio, se realizaron dos barridos por cada análisis. La evolución de la corriente, que ocurre en la interfaz electrodo – solución, en función de la tensión aplicada se representa gráficamente en voltagramas (ver Figura 3.7.b). Las mediciones se realizaban con la disolución en fase estacionaria, sin agitación.

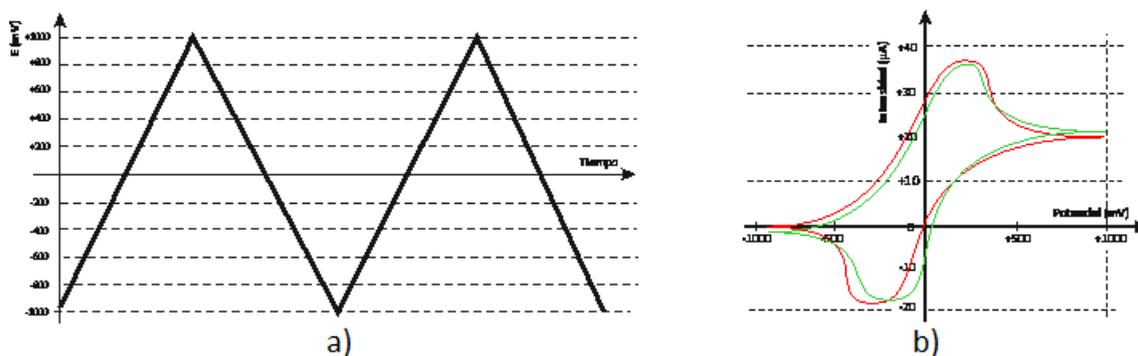


Figura 3.7. Funcionamiento de la voltametría cíclica: a) Rampa de potencial aplicado tipo diente de sierra para los metales nobles, b) voltagrama de la intensidad de corriente generada frente al potencial aplicado.

Durante los dos barridos de potencial se registros 8000 datos de intensidad de corriente. Para el tratamiento de los datos, tan solo se tuvieron en cuenta los registrados en el segundo barrido. La matriz de 4000 datos (correspondiente al segundo barrido) fue analizada mediante métodos de análisis multivariante PCA (Análisis de Componentes Principales) y PLS (Regresión por mínimos cuadrados parciales).

3.4.3. Voltametría de pulsos.

Al igual que para la realización de las medidas mediante el método electroquímico de voltametría cíclica, sin separar los electrodos de la disolución, se extraía el imán, se cambiaban las clavijas de los sensores a los conectores correspondientes al equipo de medida de voltametría y se configuraban las ventanas de valores electroquímicos para la realización de las medidas, que eran las siguientes:

- Nº iteraciones: 5
- Modo de medida: 3 electrodos (electrodo de trabajo, contraelectrodo y electrodo de referencia)
- Escala de corriente: se realizó el mismo ajuste que para la voltametría cíclica. Se llevó a cabo una ronda de prueba, y se estableció que escala era más idónea para cada muestra y cada electrodo. Se indica a continuación en la Tabla 3.3 las escalas de corriente con las que se trabajaba para cada muestra.
- Estabilización corriente y tensión: débil

Tabla 3.3. Escalas de corriente (μA) elegidas en las ventanas de valores electroquímicos para la realización de las medidas de voltametría de pulsos de las muestras G+M (miel de girasol con jarabe de maíz), B+M (miel de brezo con jarabe de maíz), G+A (miel de girasol con jarabe de agave) y G+C (miel de girasol con jarabe de caña).

Muestra	Jarabe g/100 g					
	0	5	10	20	40	60
G+M	101	101	101	101	101	101
B+M	116	116	116	116	116	-
G+A	91	91	91	91	91	91
G+C	91	116	116	196	246	392

En el caso de la voltametría de pulsos, la aplicación del potencial se realiza de manera escalonada, como muestra la Figura 3.8; tras cada incremento, el potencial vuelve a cero.

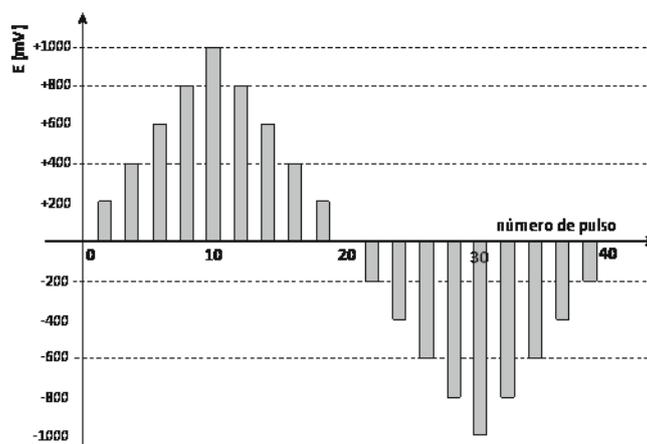


Figura 3.8. Potencial aplicado en el procedimiento de voltametría de pulsos.

El patrón de pulsos consta de 40 pulsos. Inicialmente el potencial crece en cada pulso en incrementos de 200 mV hasta alcanzar 1000 mV, para posteriormente disminuir con igual cadencia hasta -1000 mV, subiendo consecutivamente hasta completar un ciclo. Después de cada subida o bajada, el potencial vuelve a cero. Las mediciones se realizaban con la disolución en fase estacionaria, sin agitación.

Un total de 8000 valores de intensidad de corriente (25 puntos para el pulso x 40 impulsos x 8 electrodos) se registraban por cada muestra y cada iteración (5 iteraciones). Se calculó el promedio de las 5 iteraciones para crear la matriz de datos, que posteriormente fue analizada mediante métodos de análisis multivariante PCA (Análisis de Componentes Principales) y PLS (Regresión por mínimos cuadrados parciales).

Detalles a tener en cuenta: (1) Todas las muestras se ensayaron por triplicado, (2) Para la medida de todas las muestras, fue muy importante observar que no existía ninguna burbuja pegada en los electrodos, ya que la medida habría resultado incorrecta, (3) Antes de cada medida de potenciometría se realizaba un nuevo pulido y limpieza de los electrodos y (4) Si la escala de corriente elegida en la medida de la voltametría no es era la adecuada (el voltograma quedaba cortado debido a que se escogía una escala de corriente muy pequeña, o el voltograma presentaba mucho ruido por haber escogido una escala de corriente muy elevada) debíamos repetir el análisis desde el principio (desde la potenciometría), puesto que al estar el electrodo ya oxidado con la medida fallida, los datos que hubiésemos obtenido no hubieran sido adecuados.

3.4.4. Métodos de análisis multivariante.

Para el tratamiento los resultados obtenidos mediante la voltametría cíclica y la voltametría de pulsos, se aplicaron dos técnicas de análisis multivariante que son: (A) *Análisis de Componentes Principales (PCA)* y B. *Regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS)*

A. *Análisis de Componentes Principales (PCA).*

La técnica de análisis de componentes principales es una de las herramientas más utilizadas en el campo de las lenguas y las narices electrónicas. Es una herramienta matemática que

consiste en la descomposición de la matriz de datos primarios y la conversión de los ejes de coordenadas existentes en un nuevo sistema de coordenadas, que son las llamadas componentes principales (PC), ortogonales entre sí. La información que aporta cada una de ellas es diferente y exclusiva, y están ordenadas por su representatividad (Alcañiz, 2011; Campos, 2013).

Los análisis de PCA en el presente trabajo fueron realizados mediante el software *SOLO* de *Eigenvector*. Se utilizó un método de validación cruzada, denominado “*leave one out*”. Este método se utiliza cuando el número de muestras es reducido y el número de clases a obtener es elevado (Campos, 2013). Se eligen las dos primeras componentes para facilitar su representación gráfica en 2D y posteriormente se construye el modelo.

B. Regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS), para predecir Y en función de X.

Este análisis consiste en maximizar la correlación entre variables independientes (señal de corriente) y dependientes (cantidad de jarabe adicionado) (Martens & Martens, 2001). El objetivo es generar un modelo de predicción en función de las respuestas de intensidad de corriente que permita cuantificar dichas muestras.

Los análisis de PLS fueron realizados a partir del software *SOLO* de *Eigenvector*. Previo a la creación del modelo, se realizó una validación cruzada de los datos, como en el caso de PCA, llamada “*leave one out*”. Con ello extraemos el número óptimo de variables latentes para construir el modelo de predicción.

4. RESULTADOS.

4.1. Aplicación de la técnica electroquímica de potenciometría para la detección de adulteración en mieles.

La Tabla 4.1 muestra los valores promedio de potenciometría obtenidos de los últimos 5 minutos del ensayo sobre las muestras de miel de girasol y brezo, así como de las adulteraciones obtenidas adicionando las distintas cantidades de los jarabes de maíz, agave y caña (ver tabla 3.1 de Materiales y Métodos). Puesto que se trata de una técnica que requiere un tiempo de estabilización de la medida, aunque las mediciones se realizaban durante 15 minutos, tan solo se tomaron los potenciales de los últimos 5 minutos.

Tabla 4.1. Valores promedio de potenciometría obtenidos de los últimos 5 minutos del ensayo sobre las muestras G+M (miel de girasol con jarabe de maíz), B+M (miel de brezo con jarabe de maíz), G+A (miel de girasol con jarabe de agave) y G+C (miel de girasol con jarabe de caña) (cont.).

Jarabe maíz g/ 100 g	Muestra G+M (promedios)							
	Ir	Rh	Pt	Au	Ag	Co	Cu	Ni
0	0,3086	0,3110	0,3109	0,0779	-0,0298	-0,4692	-0,1259	-0,2069
5	0,2891	0,3079	0,3158	0,0593	-0,0140	-0,4650	-0,1227	-0,1961
10	0,2919	0,3118	0,3271	0,0921	-0,0069	-0,4725	-0,1017	-0,2152
20	0,3118	0,3185	0,3333	0,0976	-0,0061	-0,4703	-0,1190	-0,1858
40	0,2971	0,3146	0,3124	0,1111	-0,0114	-0,4670	-0,1166	-0,2040
60	0,3274	0,3294	0,3492	0,1359	0,0163	-0,4876	-0,0992	-0,1795

Jarabe maíz g/ 100 g	Muestra B+M (promedios)							
	Ir	Rh	Pt	Au	Ag	Co	Cu	Ni
0	0,2515	0,2555	0,2568	0,0453	0,0063	-0,4794	-0,1090	-0,2141
5	0,2468	0,2492	0,2506	0,0088	-0,0100	-0,4759	-0,1115	-0,2113
10	0,2497	0,2566	0,2632	0,0087	-0,0027	-0,4752	-0,1110	-0,2083
20	0,2615	0,2638	0,2728	0,0137	-0,0129	-0,4797	-0,1084	-0,2228
40	0,2681	0,2669	0,2729	0,0126	0,0000	-0,4796	-0,1078	-0,2065

Jarabe agave g/ 100 g	Muestra G+A (promedios)							
	Ir	Rh	Pt	Au	Ag	Co	Cu	Ni
0	0,2947	0,3042	0,3223	0,0702	-0,0139	-0,4601	-0,1243	-0,1886
5	0,2813	0,3058	0,3289	0,0028	-0,0103	-0,4656	-0,1260	-0,1937
10	0,3224	0,3410	0,3582	0,1123	0,0384	-0,4273	-0,0908	-0,1596
20	0,2980	0,3120	0,3356	0,0878	-0,0087	-0,4661	-0,1215	-0,1844
40	0,2882	0,3097	0,3306	0,0377	-0,0227	-0,4820	-0,1193	-0,1920
60	0,2897	0,3054	0,3254	0,0537	-0,0178	-0,5047	-0,1120	-0,1925

Tabla 4.1. Valores promedio de potenciometría obtenidos de los últimos 5 minutos del ensayo sobre las muestras G+M (miel de girasol con jarabe de maíz), B+M (miel de brezo con jarabe de maíz), G+A (miel de girasol con jarabe de agave) y G+C (miel de girasol con jarabe de caña).

Jarabe caña g/ 100 g	Muestra G+C (promedios)							
	Ir	Rh	Pt	Au	Ag	Co	Cu	Ni
0	0,2947	0,3042	0,3223	0,0702	-0,0139	-0,4601	-0,1243	-0,1886
5	0,2348	0,2809	0,3053	-0,0056	0,0044	-0,4701	-0,1367	-0,2120
10	0,2321	0,2801	0,2929	-0,0260	0,0033	-0,4719	-0,1443	-0,2056
20	0,2166	0,2600	0,2700	-0,0624	-0,0130	-0,4798	-0,1583	-0,1961
40	0,1774	0,2288	0,2170	-0,0905	-0,0027	-0,4882	-0,1722	-0,2179
60	0,1488	0,2078	0,1916	-0,1268	0,0022	-0,4920	-0,1785	-0,2132

Para una mejor apreciación del comportamiento de la señales obtenidas, en la Figura 4.1 se representa de forma gráfica los potenciales registrados con el equipo potenciométrico en las distintas muestras, para cada metal empleado (Ir, Rh, Pt, Au, Ag, Co, Cu y Ni). En el eje de abcisas se muestran las distintas concentraciones de jarabe y en el eje de ordenadas los potenciales obtenidos. En general se aprecia una tendencia muy lineal en todas las muestras analizadas para casi todos los electrodos. No se aprecian diferencias en la señal entre distintas concentraciones dentro de un mismo grupo de muestras. Por ello, la técnica de potenciometría no parece ser un método adecuado para detectar la incorporación de jarabes a la miel.

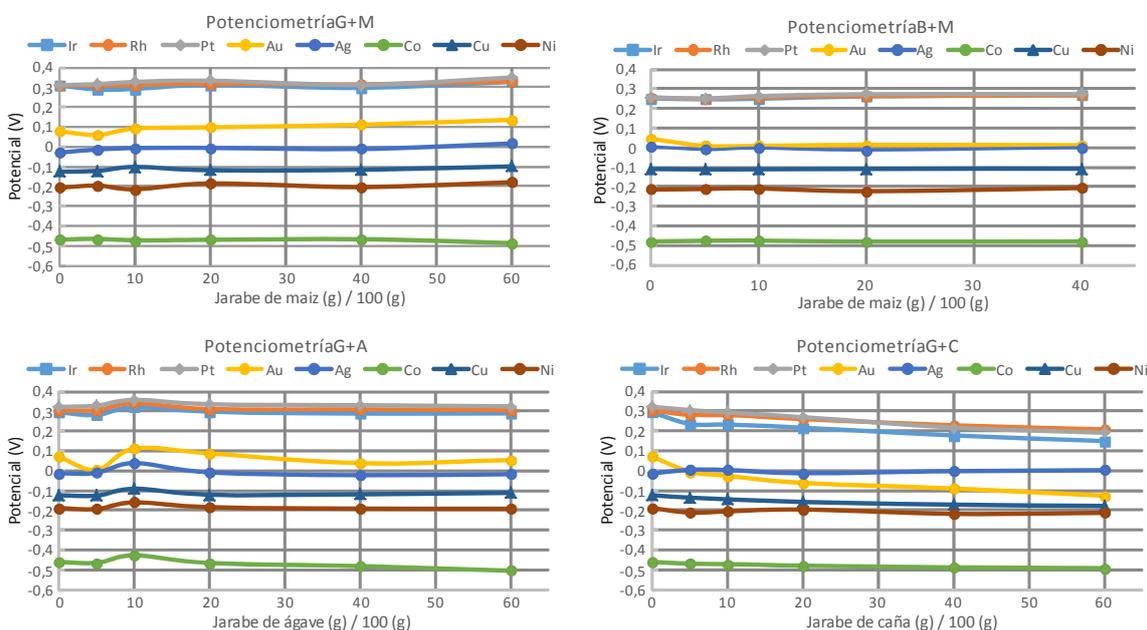


Figura 4.1. Potenciales (V) registrados con el equipo potenciométrico en las distintas muestras, para cada metal empleado (Ir, Rh, Pt, Au, Ag, Co, Cu y Ni).G+M (miel de girasol con jarabe de maíz), B+M (miel de brezo con jarabe de maíz), G+A (miel de girasol con jarabe de agave) y G+C (miel de girasol con jarabe de caña).

4.2. Aplicación de la técnica electroquímica de voltametría cíclica para la detección de adulteración en mieles.

Las Figuras 4.2 y 4.3 muestran como ejemplo los voltagramas obtenidos con los metales nobles (Ir, Rh, Pt y Au) y no nobles (Ag, Co, Cu y Ni), respectivamente, correspondientes a la muestra G+M_10 (miel de girasol adulterada con jarabe de maíz al 10%). En estas figuras se representa la evolución de la corriente generada por los sensores en función del potencial aplicado. Cuando se alcanza el potencial de reacción de alguna de las especies presentes en la disolución, la corriente registrada aumenta. Por el contrario, la corriente comienza a caer conforme la especie reacciona y su concentración disminuye.

Los voltagramas del iridio, rodio y platino son muy semejantes, mostrando dos efectos comunes en los tres: procesos de oxidación al aplicar tensiones positivas superiores a 800mV aproximadamente, y procesos de reducción en la zona de tensiones cercanas a -700 mV. En el caso del voltagrama del oro, también se aprecia el fenómeno de la oxidación sobre tensiones de 800 mV, pero el de reducción está cercano a - 300 mV.

Los metales nobles forman capas de óxido de carácter pasivante cuando son sometidos a cierto potencial y nivel de pH. En ellos, la velocidad de corrosión va a depender de los compuestos presentes en la disolución. En general, las sustancias de carácter iónico provocan de manera más importante procesos de fisisorción y quimisorción sobre los electrodos nobles. De mayor a menor fuerza de adsorción, los metales nobles se ordenan de la siguiente manera: Pt > Rh ~ Ir > Au. (Campos, 2013).

Con relación a los metales no nobles (Figura 4.3), en el presente estudio se observa que los procesos de oxidación aparecen a potenciales de oxidación menores que los observado para los nobles, ya que los metales no nobles presentan mayor capacidad de corrosión. Los electrodos de cobre y cobalto, llegaron a registrar intensidades de corriente muy superiores a las observadas para los demás metales (Pt, Ni, y los nobles).

Cuando se trabaja con electrodos de metales no nobles se pueden producir reacciones espontáneas de formación de precipitados de complejos, generados por la oxidación del metal del electrodo y alguna de las especies presentes en disolución, iónica o neutra. Esto provoca una disminución del potencial de corrosión o, a un determinado potencial constante, un aumento de la intensidad de corriente de forma significativa (Campos, 2013).

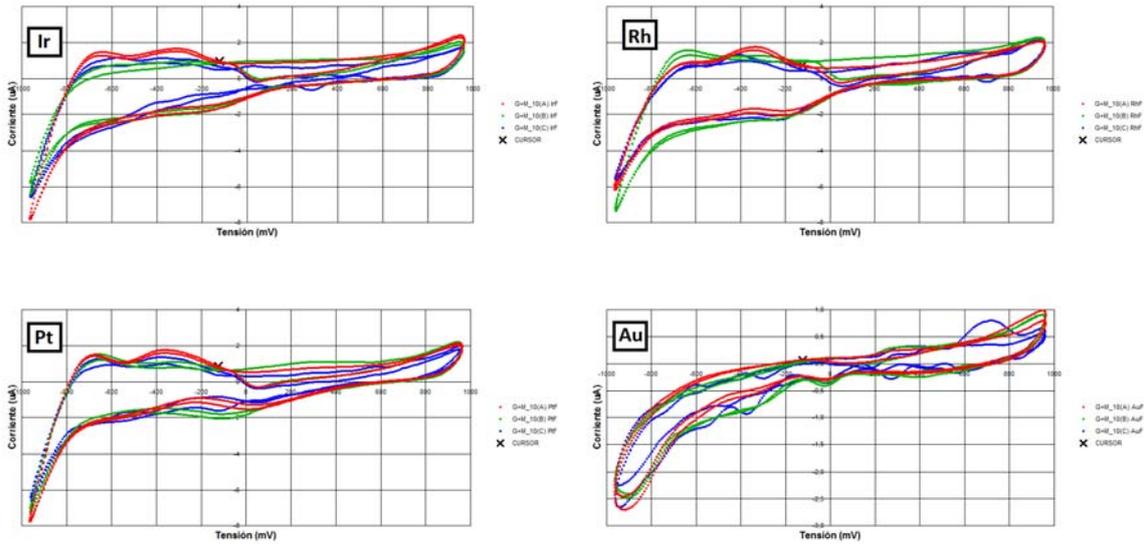


Figura 4.2. Voltagramas representando la intensidad de corriente generada por los metales nobles (Ir, Rh, Pt y Au) en función del potencial aplicado, con la técnica electroquímica voltametría cíclica, en la muestra G+M_10 (miel de girasol adulterada con jarabe de maíz al 10%).

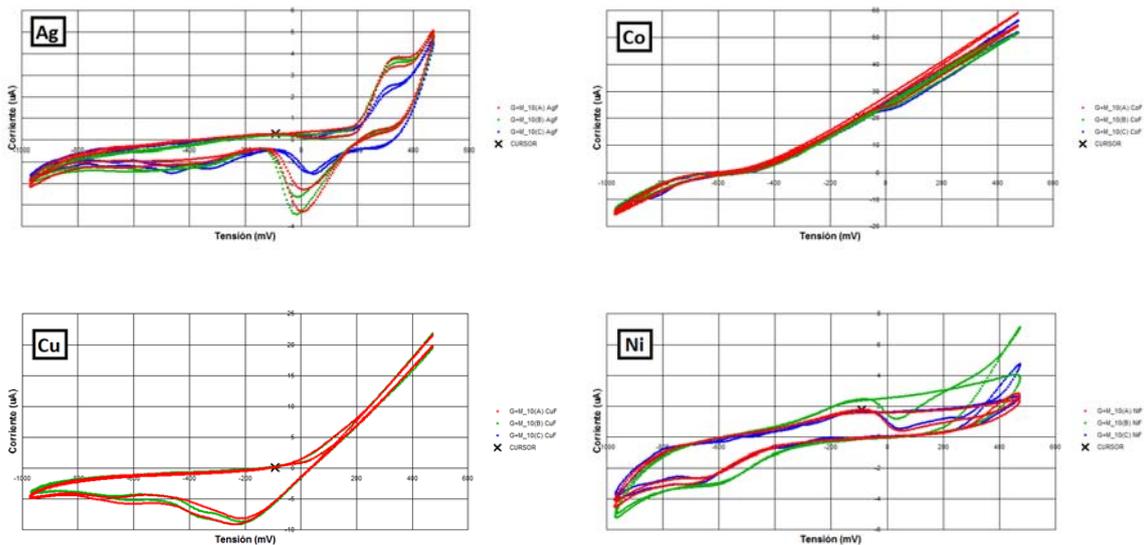


Figura 4.3. Voltagramas representando la intensidad de corriente generada por los metales no nobles (Ag, Co, Cu y Ni) en función del potencial aplicado, con la técnica electroquímica voltametría cíclica, en la muestra G+M_10 (miel de girasol adulterada con jarabe de maíz al 10%).

Con la finalidad de evaluar si la incorporación de jarabe a la miel es apreciada por la señal voltamétrica cíclica, las Figuras 4.4 (con Pt y Au) y 4.5 (con Ag y Co) representan de forma superpuesta los voltagramas de una muestra de miel de girasol pura, sin jarabe de agave añadido (G+A_0), y de una muestra de miel de girasol, con un 60% jarabe de agave añadido (G+A_60). En todos los casos se aprecian puntos en los que desciende la intensidad de la corriente cuando la muestra de miel (líneas rojas) contiene el jarabe incorporado (líneas verdes). Estos descensos son más acusados en las medidas realizadas con los metales no nobles, ya que la reactividad de éstos es mayor que la de los nobles.

Estas disminuciones de la señal, se pueden atribuir a que la miel presenta en su composición determinados compuestos con capacidad antioxidante como son los flavonoides, los polifenoles y los ácidos fenólicos (Juan-Borrás 2015), que no están presentes en el jarabe. Al adicionarlo, se produce una dilución de estos compuestos y, por lo tanto, una atenuación de la señal que ellos provocan.

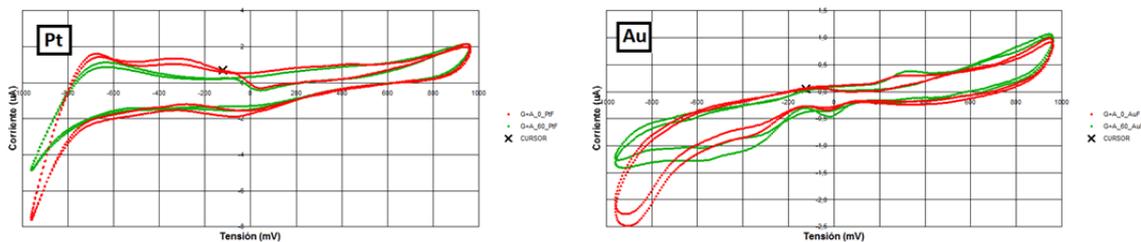


Figura 4.4. Voltagramas superpuestos de las muestras G+A_0 (miel de girasol adulterada al 0% con jarabe de agave) y G+A_60 (miel de girasol adulterada al 60% con jarabe de agave) representado la corriente generada por los electrodos Pt y Au frente al potencial aplicado.

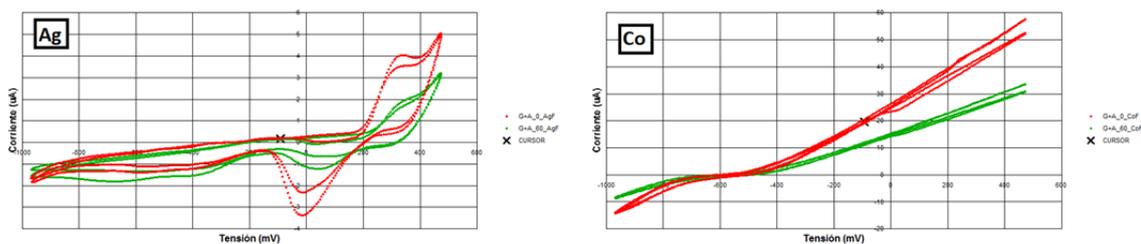


Figura 4.5. Voltagramas superpuestos de las muestras G+A_0 (miel de girasol adulterada al 0% con jarabe de agave) y G+A_60 (miel de girasol adulterada al 60% con jarabe de agave) representado la corriente generada por los electrodos Pt y Au frente al potencial aplicado.

Para dar una visión global de la información generada en voltametría cíclica por todos los electrodos en todas las muestras evaluadas y apreciar posibles agrupaciones de las muestras (*clusters*), se aplicó un análisis de los componentes principales (PCA). Cada muestra analizada generaba 8000 intensidades de corriente (1000 por electrodo) al aplicar los 2 barridos de potencial (4000 intensidades por cada barrido). Para el estudio matemático de estos datos, se creó una matriz de las intensidades generadas en el segundo barrido (4000 datos).

La Figura 4.6 presenta los PCA de todas las muestras G+M (miel de girasol y jarabe de maíz), B+M (miel de brezo y jarabe de maíz) y G+A (miel de girasol + jarabe de agave). Las dos primeras componentes explican respectivamente el 56.08 %, 43.32 y 63.16%, de la variabilidad de los datos. En los tres casos la PC1 diferencia claramente las muestras en relación a su contenido en jarabe, mostrando un fuerte desplazamiento hacia la izquierda conforme la concentración de jarabe añadido aumenta. Probablemente esta tendencia esté relacionada con la dilución de los compuestos antioxidantes ocasionada al aumentar la proporción de jarabe de maíz y agave a ambos tipos de miel.

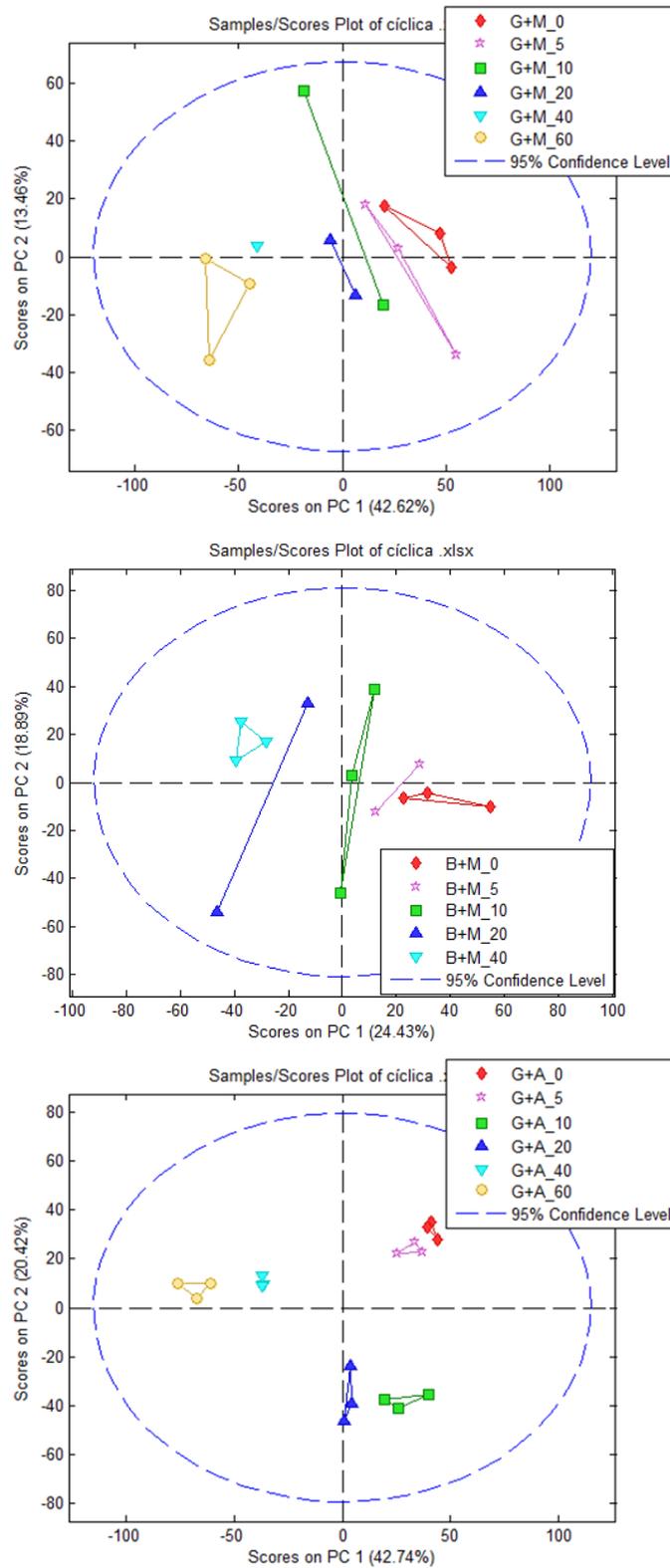


Figura 4.6. Gráficas de análisis PCA (*Principal Component Analysis*) de las muestras G+M (miel de girasol y jarabe de maíz), B+M (miel de brezo y jarabe de maíz) y G+A (miel de girasol + jarabe de agave) realizadas con los datos obtenidos por el método voltametría cíclica en el segundo barrido.

La Figura 4.7 representa el PCA obtenido con los datos de voltametría cíclica para las muestras de miel de girasol pura y adulterada con jarabe de caña G+C (miel de girasol + jarabe de caña). Las dos primeras componentes explican el 69.66% de la variabilidad de los datos. Se observa un comportamiento contrario al de los anteriores PCA. Conforme la adición de jarabe de caña aumenta, la tendencia es hacia la derecha. Posiblemente, esta tendencia se deba a que el jarabe de caña tiene mayor capacidad antioxidante (contiene un 0,32% de ácido cítrico como acidulante, tal y como se informa en la etiqueta) y conductividad que la miel. Todo esto puede influir en una mayor intensidad de corriente por los electrodos.

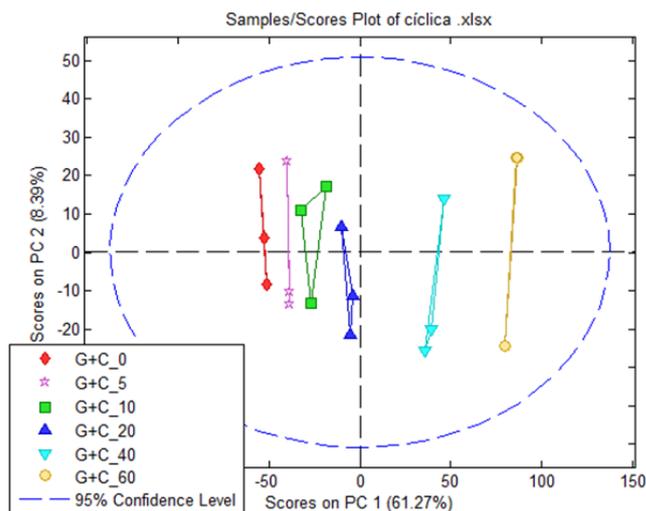


Figura 4.7. Gráficas de análisis G+C (miel de girasol + jarabe de caña) realizados con los datos obtenidos por el método voltametría cíclica en el segundo barrido.

4.3. Aplicación de la técnica electroquímica de voltametría de pulsos para la detección de adulteración en mieles.

La Figura 4.8 (metales nobles) y la Figura 4.9 (metales no noble) muestran un ejemplo de la respuesta electroquímica obtenida al aplicar la secuencia de pulsos para la muestra compuesta por miel de brezo y jarabe de maíz B+M_40 (miel de brezo adulterada con jarabe de maíz al 40%). A diferencia de lo que sucede en la voltametría cíclica, a simple vista no se pueden detectar curvas características que nos indiquen la presencia de ciertos compuestos, no aportan apenas información por sí solas. Lo que sí se puede observar es que, al ser el cobalto y el cobre los metales más reactivos, son los que registran una mayor intensidad de corriente (ver Figura 4.9).

Con el fin de evaluar si la técnica de voltametría de pulsos es capaz de apreciar la incorporación de jarabe a la miel, en las Figuras 4.10 (con Ir y Rh) y 4.11 (con Co y Cu) se representan de forma superpuesta el voltagrama de una muestra de miel de girasol pura (G+C_0), representado por la línea roja, el de una muestra de miel de girasol con un 20% de jarabe de caña añadido (G+C_20), representado por la línea verde, y el de una muestra de miel de girasol, con un 60% jarabe de caña añadido (G+C_60), representado por la línea azul. Se observa que la intensidad de corriente aumentó exponencialmente debido a la adición de jarabe de caña. Como ya se ha mencionado más arriba, esto probablemente se deba al contenido del 0.32% de ácido cítrico del jarabe de caña y al aumento de conductividad que aporta a la miel este jarabe. Ambos factores aumentan la señal registrada por voltametría de pulsos.

Superponiendo las respuestas electroquímicas de la miel y la miel adulterada, sí se pueden apreciar diferencias significativas que con la respuesta de una formulación aislada no obteníamos.

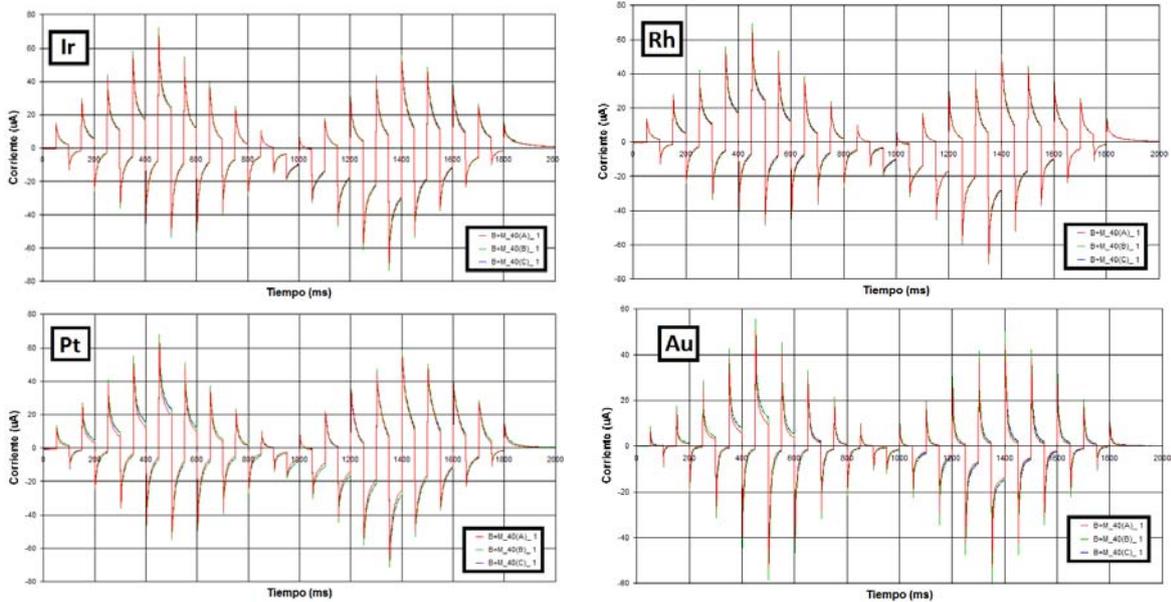


Figura 4.8. Respuesta electroquímica de la muestra B+M_40 (miel de brezo adulterada con jarabe de maíz al 40%) obtenida por los sensores de metales nobles (Ir, Rh, Pt y Au) aplicando el método de voltametría de pulsos.

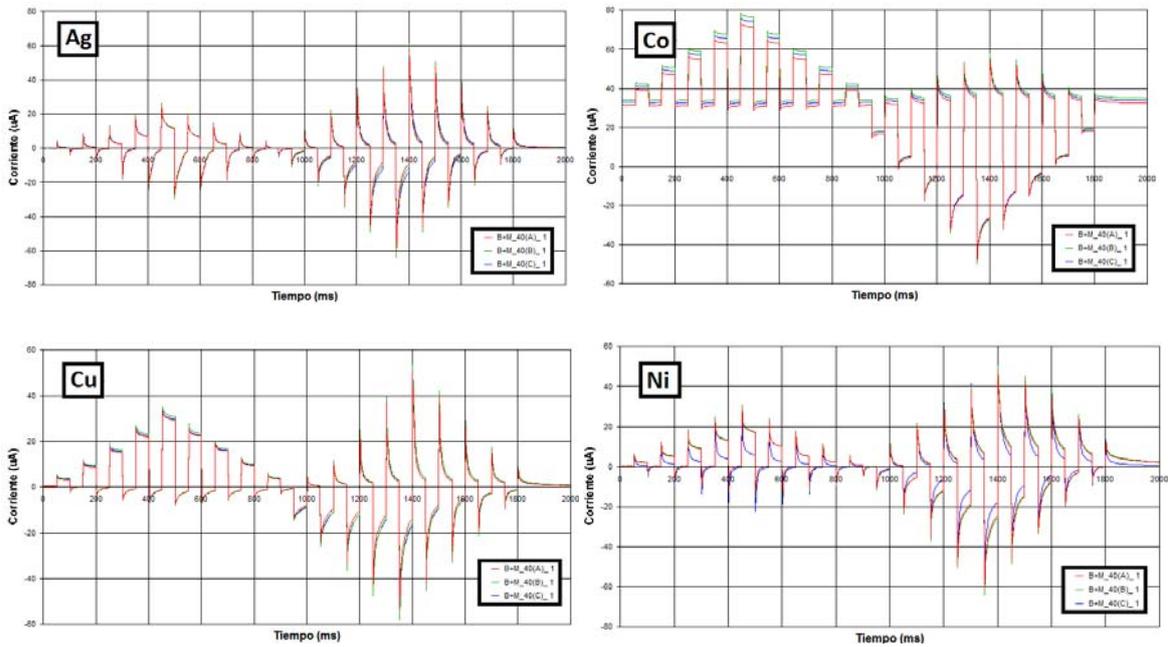


Figura 4.9. Respuesta electroquímica de la muestra B+M_40 (miel de brezo adulterada con jarabe de maíz al 40%) obtenida por los sensores de metales no nobles (Ag, Co, Cu y Ni) aplicando el método de voltametría de pulsos.

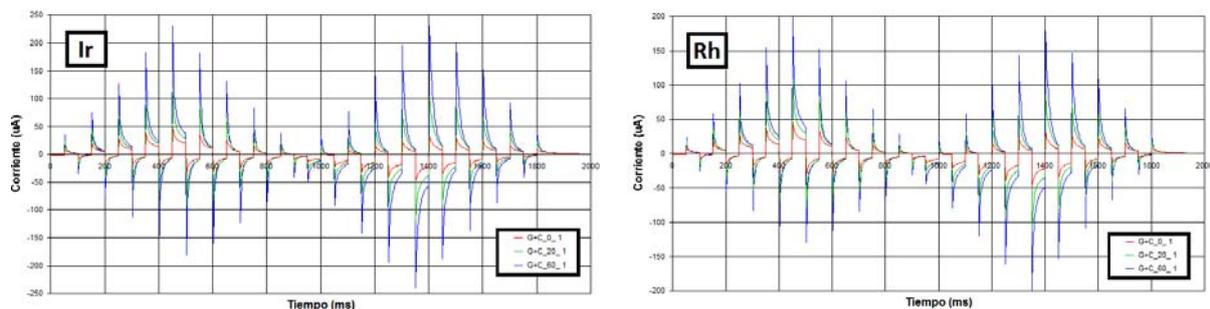


Figura 4.10. Respuestas electroquímicas de las muestras G+C_0 (miel de girasol adulterada con jarabe de caña al 0%), G+C_20 (miel de girasol adulterada al 20% con miel de caña y G+C_60 (miel de girasol adulterada con jarabe de caña al 60%) obtenida por los sensores de metales nobles (Ir y Rh) aplicando el método de voltametría de pulsos.

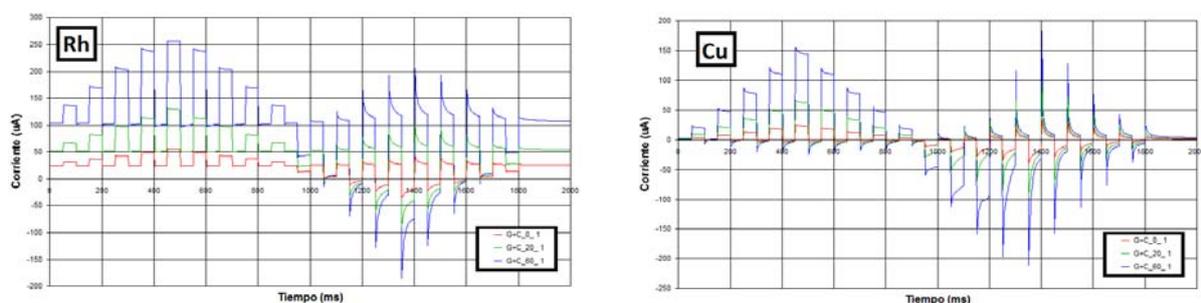


Figura 4.11. Respuestas electroquímicas de las muestras G+C_0 (miel de girasol adulterada con jarabe de caña al 0%), G+C_20 (miel de girasol adulterada al 20% con miel de caña y G+C_60 (miel de girasol adulterada con jarabe de caña al 60%) obtenida por los sensores de metales no nobles (Co y Cu) aplicando el método de voltametría de pulsos.

Para proporcionar una visión global de la información generada en voltametría de pulsos por todos los electrodos en todas las muestras evaluadas apreciar posibles agrupaciones de las muestras (*clusters*), se aplicó un análisis de los componentes principales (PCA). Un total de 8000 valores de intensidad de corriente (25 puntos para el pulso x 40 impulsos x 8 electrodos) se registraron para cada muestra.

En la Figura 4.12 se muestran los Análisis de Componentes Principales de todas las muestras G+M (miel de girasol y jarabe de maíz), B+M (miel de brezo y jarabe de maíz) y G+A (miel de girasol + jarabe de agave). Las dos primeras componentes explican respectivamente el 77.27 %, 61.02 y 68.33%, de la variabilidad de los datos. En relación al contenido de jarabe, la PC1 es capaz de diferenciar las muestras. En los tres casos, la tendencia de los resultados es hacia la izquierda conforme el porcentaje de jarabe adicionado es mayor. Se puede relacionar esta tendencia con la dilución de los compuestos antioxidantes presente en la miel pura ocasionada por la adición de jarabe de maíz y agave.

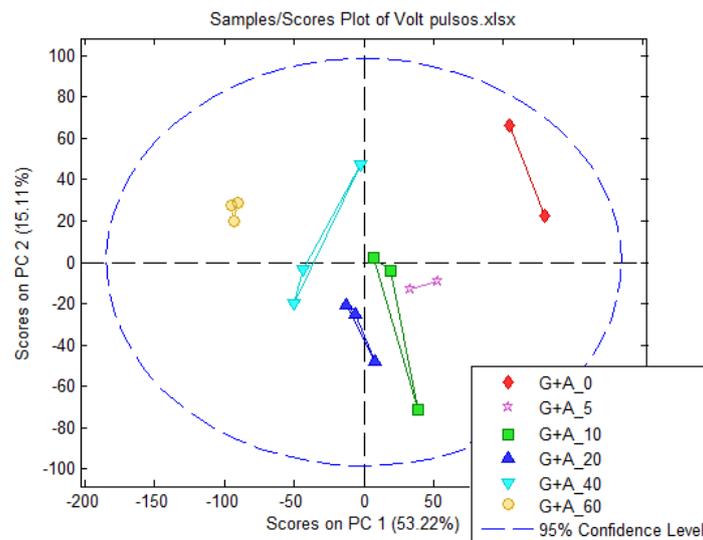
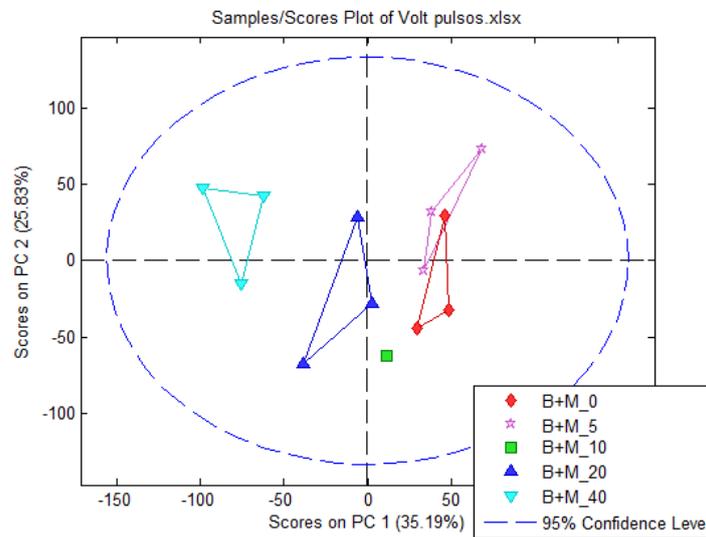
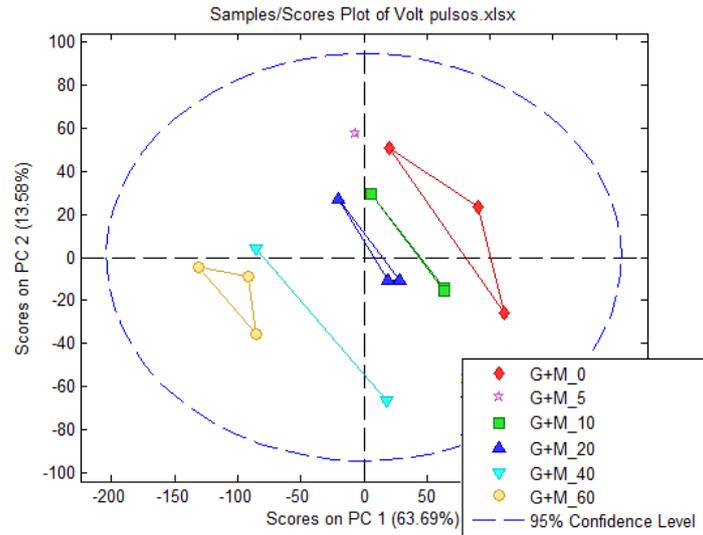


Figura 4.12. Gráficas de análisis PCA (*Principal Component Analysis*) de las muestras G+M (miel de girasol y jarabe de maíz), B+M (miel de brezo y jarabe de maíz) y G+A (miel de girasol + jarabe de agave) realizadas con los resultados obtenidos por el método voltametría de pulsos.

La Figura 4.13 presenta el PCA de la muestra G+C (miel de girasol + jarabe de caña). Las dos primeras componentes explican el 71.89% de la variabilidad de los datos. La PC1 diferencia las muestras de distinto grado de adulteración de manera excelente, mostrando un fuerte desplazamiento a la derecha, contrario a la tendencia de las otras muestras (Figura4.12). Se cree que la presencia de ácido cítrico (0.32% indicado en la etiqueta) en el jarabe de caña y la mayor conductividad del jarabe respecto de la miel, sean los motivos de dicha tendencia. Ambos factores generan en la voltametría de pulsos unas intensidades de corriente registradas mayores.

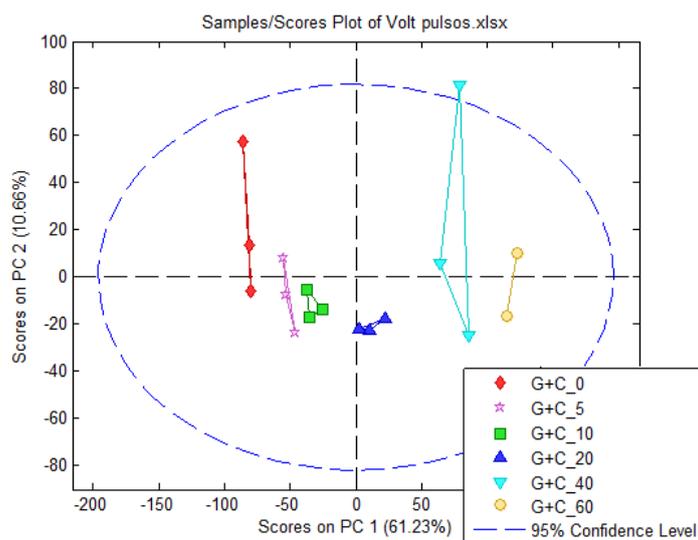


Figura 4.13. Gráfica de análisis PCA (*Principal Component Analysis*) de la muestra G+C (miel de girasol + jarabe de caña) realizada con los resultados obtenidos por voltametría de pulsos.

4.4. Obtención de modelos de predicción para cuantificar concentraciones de jarabe adulterante.

Para la obtención de modelos de predicción que permitan cuantificar la adición de jarabes adulterantes a las mieles, se ha aplicado un análisis de regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS) a las medidas obtenidas mediante voltametría cíclica y de pulsos.

En la Tabla 4.2 se muestran los resultados correspondientes a la validación de los modelos generados para las distintas mieles y adulteraciones analizadas mediante la voltametría cíclica. De la observación de dicha tabla se puede deducir que la predicción de la concentración de jarabe adicionado, puede hacerse correctamente mediante este método electroquímico. El coeficiente de correlación fue prácticamente igual a 1.0. El número de variables latentes se encuentra entre 3 y 4, que resulta moderado e indica que la mejor regresión se consigue con un reducido número de variables independientes. Por último, indicar que los errores RMSEC y RMSECV son todos menores de 10% (los errores se miden en las mismas unidades de concentración de jarabe en la muestra) y todos menos uno, menores del 5%, valores en general menores que los saltos de concentración que existen entre las muestras.

En términos generales, podemos concluir que la capacidad predictiva del modelo PLS aplicado en la voltametría cíclica puede calificarse de muy buena, y por tanto, PLS parece ser una técnica apropiada en este caso para la cuantificación y predicción de concentraciones de jarabe o sirope.

Tabla 4.2. Resultados de la validación de los modelos PLS en el análisis de voltametría cíclica.

Muestra	R ²	Nº V. latentes	RMSEC	RMSECV
G+M	0.990	3	2.1583	9.1767
B+M	0.997	4	0.7895	5.5023
G+A	0.999	4	0.6631	3.0754
G+C	1.000	4	0.3994	1.9639
Promedio	0.997	3.75	1.0026	4.9296

En la Tabla 4.3 se muestran los resultados correspondientes a la validación de los modelos generados para las distintas mieles y adulteraciones analizadas mediante la voltametría de pulsos. Los coeficientes de correlación son cercanos a 1.0. El número de variables latentes se encuentra entre 2 y 7, algo mayor en media que en el caso de la voltametría cíclica, que aún resulta moderado e indica que la mejor regresión se consigue con un número de variables independientes un poco superior. Por último indicar que los errores RMSEC y RMSECV son de nuevo todos menores de 10% y eliminando el máximo valor de RMSECV, todos serían menores del 5%, valores en general menores que los saltos de concentración que existen entre las muestras.

Tabla 4.3. Resumen de valores de PLS en el análisis de voltametría de pulsos.

Muestra	R ²	Nº V. latentes	RMSEC	RMSECV
G+M	0.986	5	2.4905	9.4273
B+M	0.961	2	2.9820	5.8920
G+A	0.997	7	1.1075	3.7290
G+C	1.000	5	0.3479	1.5918
Promedio	0.986	4.75	1.7324	6.2006

A modo de ilustración de los comentarios anteriores, en la Figura 4.14 y 4.15 se muestran las gráficas de concentración observada frente a concentración predicha de jarabe adicionado en las mieles analizadas mediante voltametría cíclica (Figura 4.14) y voltametría de pulsos (Figura 4.15).

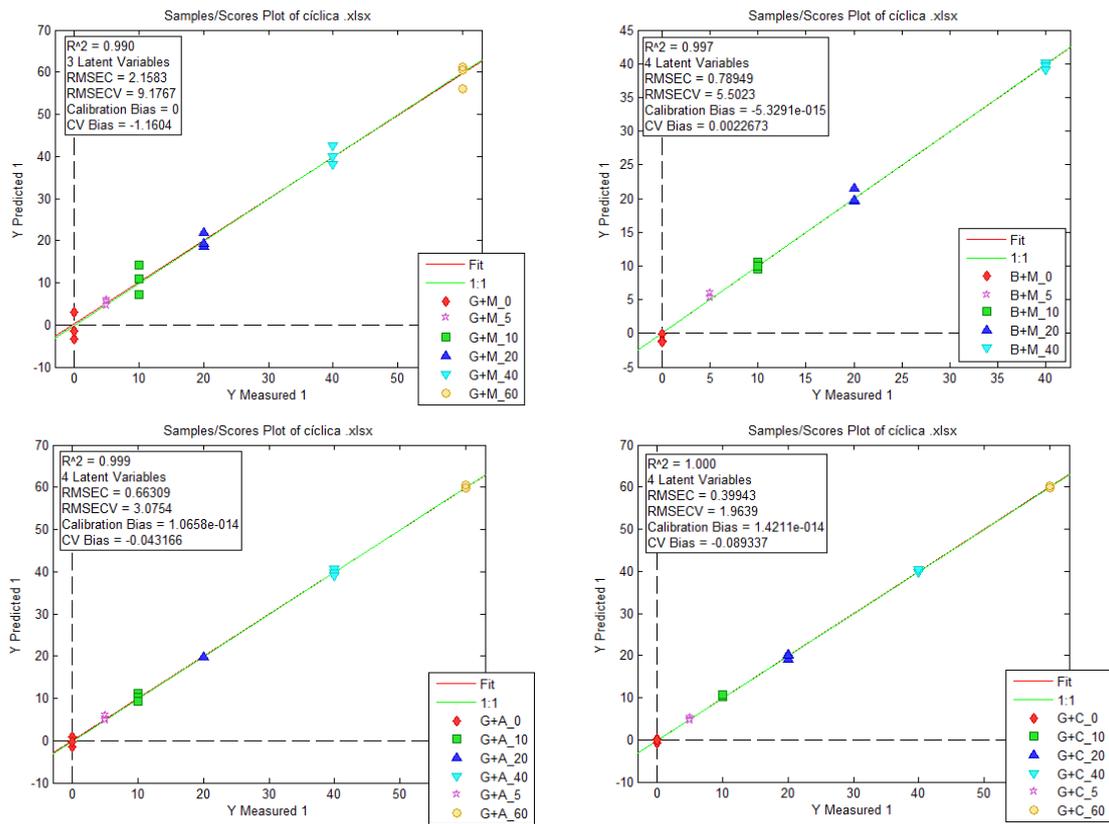


Figura 4.14. Gráficas de observado frente a predicho de la validación de los modelos PLS de la concentración de jarabe adicionado de todas las muestras, G+M (miel de girasol y jarabe de maíz), B+M (miel de brezo y jarabe de maíz), G+A (miel de girasol + jarabe de agave) y G+C (miel de girasol + jarabe de caña) realizadas a partir de los datos obtenidos de la voltametría cíclica con todos los electrodos (Ir, Rh, Pt, Au, Ag, Co, Cu y Ni).

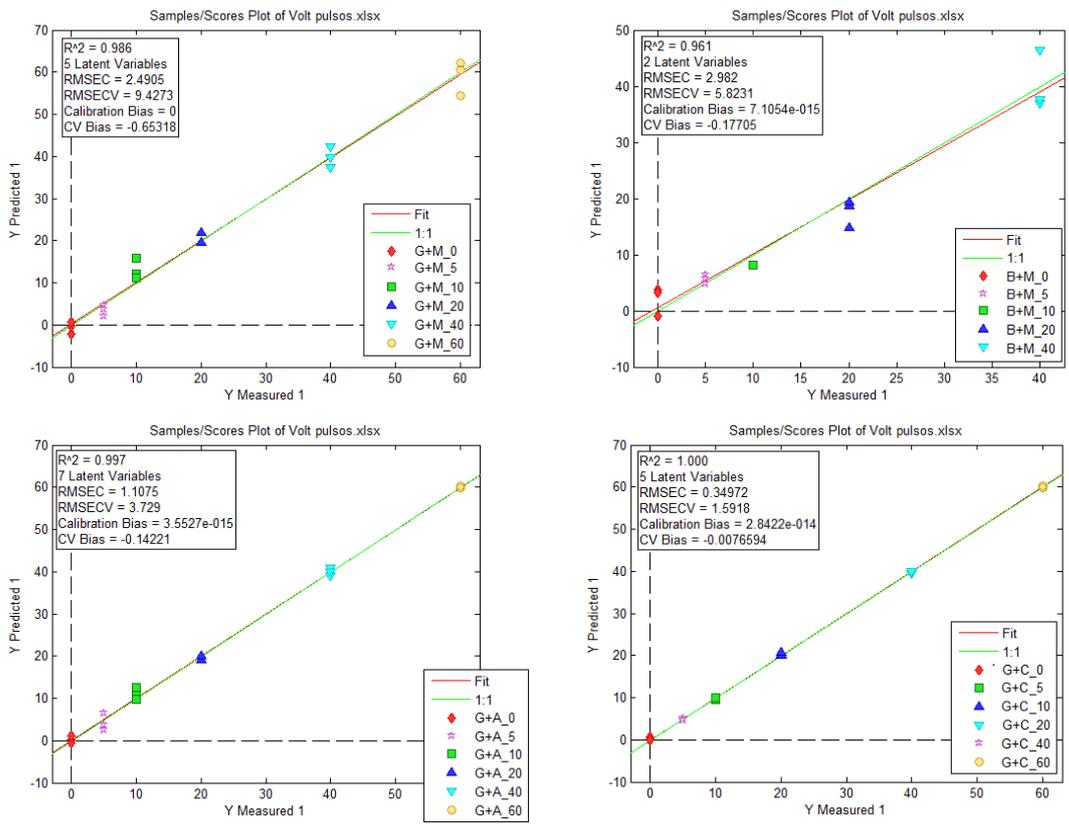


Figura 4.15. Gráficas de observado frente a predicho de la validación de los modelos PLS de la concentración de jarabe adicionado de todas las muestras, G+M (miel de girasol y jarabe de maíz), B+M (miel de brezo y jarabe de maíz), G+A (miel de girasol + jarabe de agave) y G+C (miel de girasol + jarabe de caña), realizadas a partir de los datos obtenidos de la voltametría de pulsos con todos los electrodos (Ir, Rh, Pt, Au, Ag, Co, Cu y Ni).

En resumen, se puede afirmar que los resultados de los análisis PLS obtenidos a partir de los datos de ambas técnicas voltamétricas, fueron apropiados para modelizar la predicción de la concentración de jarabe adicionado a las mieles. Con los datos obtenidos de mayor R^2 , menor RMSEC y menor RMSECV, por lo tanto, menor error, el método de voltametría cíclica parece mostrar mejores resultados. Sin embargo, para poder ser concluyentes, sería necesario aumentar el número de experiencias.

5. CONCLUSIONES.

1. La técnica de potenciometría no ha resultado ser un método adecuado para detectar la incorporación de jarabes a la miel, ya que con ella no se detectan diferencias en la señal cuando a una misma miel se le incorporan distintas cantidades de jarabe.
2. Las técnicas de voltametría, tanto cíclica como de pulsos, son capaces de identificar la adición de jarabes a las mieles. Este hecho puede ser debido a que estas técnicas permiten detectar la presencia de determinadas sustancias presentes en las mieles, probablemente aquellas con capacidad antioxidante. Estas sustancias se diluyen en las mezclas de mieles con jarabes siempre, cuando se trate de jarabes que no las contengan.
3. Se obtuvieron mejores resultados cuando a las mieles se les incorporaba jarabe de agave o caña, posiblemente debido a que el jarabe de maíz utilizado en este estudio tenía una composición más similar a la miel.
4. Mediante la aplicación de PLS se han obtenido buenos modelos de predicción de la adición de jarabe adicionado a las mieles para ambas técnicas voltamétrica, especialmente para la voltametría cíclica.

Los resultados obtenidos en este trabajo, aunque no son concluyentes, son esperanzadores. Por este motivo, se propone continuar el estudio planteando ciertas mejoras: (1) Probar con concentraciones más bajas que se ajusten a la realidad de las adulteraciones encontradas en las mieles; (2) trabajar con otros jarabes de composición lo más semejante posible a la miel; (3) mejorar las condiciones experimentales, utilizando un pulidor mecánico, a fin de conseguir unos resultados más reproducibles, y también aislar el dispositivo de lengua electrónica con una jaula de Faraday para conseguir un mejor aislamiento del posible ruido y obtener unos resultados más limpios.

6. BIBLIOGRAFÍA.

- ALCAÑIZ, M., 2011, *Diseño de un sistema de lengua electrónica basado en técnicas electroquímicas voltamétricas y su aplicación en el ámbito agroalimentario*. Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Valencia. Departamento de Ingeniería Electrónica. 295 pp.
- ALI, A.T.; CHOWDHURY, M.N. & AL-HUMAYYD, M.S., 1991, Inhibitory effect of natural honey on *Helicobacter pylori*. *Trop Gastroenterol* 12:73–77.
- ALJADI, A.M. & KAMARUDDIN, M.Y., 2004, Evaluation of the phenolic contents and antioxidant capacities of two Malaysian floral honeys. *Food Chem* 85:513–518.
- BERTELLI, D.; LOLLI, M.; PAPOTTI, G.; BORTOLOTTI, L.; SERRA, G. & PLESSI, M., 2010, Detection of Honey Adulteration by Sugar Syrups Using One-Dimensional and Two-Dimensional High-Resolution Nuclear Magnetic Resonance. *J. Agric. Food Chem.*, 58 (15): 8495–8501.
- BOGDANOV, S, 2014, *The honey book*. Ed. Bee Product Science.
- CAMPOS, I., 2013, *Sensores electroquímicos tipo lengua electrónica voltamétrica aplicados al control medioambiental y a la industria alimentaria*. Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Valencia. Departamento de química, 234 pp.
- CAMPOS, I.; ALCAÑIZ, M.; AGUADO, M.; BARAT, R.; FERRER, J.; GIL, L.; MARRAKCHI, M.; MARTÍNEZ-MAÑEZ, R.; SOTO, J. & VIVANCOS, J.L., 2012, A voltammetric electronic tongue as tool for water quality monitoring in wastewater treatment plants. *Water Research* 46: 2605-2614.
- CAMPOS, I.; BATALLER, R.; ARMERO, R.; GANDIA, J. M.; SOTO, J.; MARTÍNEZ-MÁÑEZ, R. & GIL-SÁNCHEZ, L., 2013, Monitoring grape ripeness using a voltammetric electronic tongue. *Food Research International* 54 : 1369–1375.
- CONSEJO DE EUROPA, 2001, *Directiva Europea 2001/110/EC del Consejo de 20 de diciembre de 2001 relativa a la miel*. Publicación 12.01.2002 L 10/47.
- CORDELLA, C.; MOUSSA, I.; MARTEL, A.; SBIRRAZZUOLI, N. & LIZZANI-CUVELIER, L., 2002, Recent Developments in Food Characterization and Adulteration Detection: Technique-Oriented Perspectives. *J. Agric. Food Chem.*, 2002, 50 (7): 1751–1764
- DECRETO 2484/1967, 1967, de 21 de septiembre, por el que se aprueba el texto del *Código Alimentario Español*, BOE núm. 248, de 17 de octubre.
- DIAS, L.A.; PERES, A.M.; VELOSO, A.C.A.; REIS, F.S.; VILAS-BOAS, M. & MACHADO, A.A.S.C, 2009, An electronic tongue taste evaluation: Identification of goat milk adulteration. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 136 (1): 209–217.
- DIAS, L.A.; PERES, A.M.; VILLAS-BOAS, M.; ROCHA, M.A.; ESTEVINHO, L. & MACHADO, A.A.S.C, 2008, An electronic tongue for honey classification, *Microchim Acta*, 163: 97–102.
- ESCRICHE, I.; KADAR, M.; DOMENECH, E. & GIL-SANCHEZ, L., 2012, A potentiometric electronic tongue for the discrimination of honey according to the botanical origin. Comparison with traditional methodologies: Physicochemical parameters and volatile profile. *Journal of Food Engineering*, 109: 449–456.
- ESCRICHE, I.; KADAR, M.; JUAN-BORRÁS, M. & DOMENECH, E., 2011, Using flavonoids, phenolic compounds and headspace volatile profile for botanical authentication of lemon and orange honeys. *Food Research International* 44: 1504–1513.
- ESCUELA DE APICULTURA, 2015, *La miel: Conocimiento, producción, acondicionamiento para el consumo y comercialización*, visto 4 de julio de 2015. <http://www.pajueloapicultura.com/aulavirtual/course/view.php?id=6>

- GARCÍA-BREIJO, E., 2005, *Diseño de un sistema multisensor en tecnología thick-film; fabricación, caracterización y estudio de su aplicabilidad a la medida de parámetros físico-químicos*. Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Valencia. Departamento de Ingeniería Electrónica.
- GHELDOLF, N; WANG, XH & ENGESETH, NJ, 2002, Identification and quantification of antioxidant components of honeys from various floral sources. *J Agric Food Chem* 50:5870–5877.
- GIL, L., 2010. *Diseño de lenguas electrónicas potenciométricas construidas con electrodos metálicos y con tecnología de capa gruesa para análisis de medios complejos*. Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Valencia. Departamento de Ingeniería Electrónica.
- GÓMEZ-CARAVACA, A.M.; GÓMEZ-ROMERO, M.; ARRAEZ-ROMAN, D.; SEGURA-CARRETERO, A. & FERNANDEZ-GUTIERREZ, A., 2006, Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *J Pharm Bio Anal*, 41:1220–1234.
- GUTÉS, A.; CÉSPEDES, F. & DEL VALLE, M. 2007. Electronic tongues in flow analysis. *Analytica Chimica Acta*, 600, 90-96.
- JIMÉNEZ, C.; MUÑOZ, F. J.; BRATOV, A. Y DOMÍNGUEZ, C., 2002, Lenguas electrónicas: sensores químicos aplicados a la medida del sabor y al control de calidad de los alimentos, *Perceptnet*, 13: 1697-4131, Octubre.
- JUAN-BORRÁS, M.; DOMENECH, E.; CONCHADO, A. & ESCRICHE, I., 2015, Physicochemical Quality Parameters at the Reception of the Honey Packaging Process: Influence of Type of Honey, Year of Harvest, and Beekeeper. *Journal of Chemistry*, 2015: 1-6.
- LABRADOR, R.H., 2009, *Diseño y caracterización de sensores químicos en estado sólido. Aplicación de modelos teóricos para el estudio de interferencias*. Tesis doctoral. Universitat Politécnica de Valencia. Instituto de Química Molecular Aplicada, 251 pp.
- LASLO, L. & MARGHITAS, L.A., 2004, Honey and its therapeutic effects. *Buletinul Universitatii de Stiinta Agricole si Medicina Veterinara Cluj Napoca. Seria Zootehnie Biotehnologii* 60:246–50.
- MARTENS, H. & MARTENS, M, 2001, *Multivariate Analysis of Quality: An Introduction*, John Wiley & Sons, Ltd., 466 pp.
- MARTÍNEZ-MÁÑEZ, R.; SOTO, J.; GARCIA-BREIJO, E.; GIL, L.; IBÁÑEZ J. & LLOBET, E., 2005, An “electronic tongue” design for the qualitative analysis of natural waters. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 104(2): 302–307.
- MOLAN, P.C., 1992, The antibacterial properties of honey. *BeeWorld* 73: 59–76.
- OSZTMIAŃSKI, J. & LEE, C.Y., 1990, Inhibition of polyphenols oxidase activity and browning by honey. *J Agric Food Chem* 38:1892–1895.
- PADOVAN, G.J.; DE JONG, D.; RODRIGUES, L.P. & MARCHINI, J.S., 2003, Detection of adulteration of commercial honey samples by the 13C/12C isotopic ratio, *Food Chemistry*, 82(4): 633–636.
- PARRA, V.; ARRIETA, A.A.; FERNÁNDEZ-ESCUADERO, J.A.; RODRÍGUEZ-MENDEZ, M.L. & DE SAJA, J.A., 2006, Electronic tongue based on chemically modified electrodes and voltammetry for the detection of adulterations in wines. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 118(1–2): 448–453.
- QIU, P. Y.; DING, H. B.; TANG, Y. K. & XU, R. J., 1999, Determination of Chemical Composition of Commercial Honey by Near-Infrared Spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.*, 1999, 47(7): 2760–2765.

- REAL DECRETO 1049/2003, 2003, *Norma de calidad relativa a la miel*, BOE nº 186, de 6 de agosto, 30181-30183.
- RIVERA, H., 2012, *Análisis y determinación de velocidad de corrosión en armaduras de hormigón armado, sometidas a sustancias agresivas e inhibidoras, mediante voltametría cíclica y espectroscopía de impedancia*. Tesis de Master. Universidad Politécnica de Valencia, E.T.S. de Ingeniería de la Edificación, 124 pp.
- RUDNITSKAYA, A.; LEGIN, A.; MAKARYCHEV, S.; GORYACHEVA, O. & VLASOV, Y., 2001, Quality of Fruit Juices Using an Electronic Tongue, *Analytical Sciences*, 17(Supl.): 309-312.
- SIMSEK, A.; BILSEL, M. & GOREN, A.C., 2012, 13C/12C pattern of honey from Turkey and determination of adulteration in commercially available honey samples using EA-IRMS. *Food Chemistry*, 130(4): 1115–1121
- SIVAKESAVA, S. & IRUDAYARAJ, J., 2001, A Rapid Spectroscopic Technique for Determining Honey Adulteration with Corn Syrup, *Journal of Food Science*, 66(6): 787–791.
- VIUDA-MARTOS, M.; RUIZ-NAVAJAS, Y.; FERNANDEZ-LOPEZ, J. & PEREZ-ALVAREZ, J.A., 2008, Functional Properties of Honey, Propolis, and Royal Jelly. *Journal of Food Science*. 73: 117-118.
- VLASOV, Y.G.; LEGIN, A.V. & RUDNITSKAYA, A.M., 2008, Electronic Tongue: Chemical Sensor Systems for Analysis of Aquatic Media, *Russian Journal of General Chemistry* 78: 2532-2544.
- WANG, J.; XUE, X.; DU, X.; CHENG, N.; CHEN, L.; ZHAO, J.; ZHENG, J. & CAO, W., 2014, Identification of Acacia Honey Adulteration with Rape Honey Using Liquid Chromatography–Electrochemical Detection and Chemometrics, *Food Analytical Methods*, 7(10): 2003-2012.
- WIE, Z.; WANG, J. & LIAO, W., 2009. Technique potential for classification of honey by electronic tongue. *Journal of Food Engineering*, 94: 260–266.
- YAO, L.; DATTA, N.; TOMAS-BARBERAN, F.A.; FERRERES, F.; MARTOS, I. & SINGANUSONG, R., 2003, Flavonoids, phenolic acids and abscissic acid in Australian and New Zealand *Leptospermum* honeys. *Food Chem* 81(2): 159–68.
- ZHUIYKOV, S., 2012, Solid-state sensors monitoring parameters of water quality for the next generation of wireless sensor networks. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 161(1): 1-20.