

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA AGRONÒMICA I
DEL MEDI NATURAL

MONITORIZACIÓN DE LA ESTABILIDAD DE ZUMO DE NARANJA PASTEURIZADO MEDIANTE LENGUA ELECTRÓNICA POTENCIOMÉTRICA.

TRABAJO FIN DE MÁSTER UNIVERSITARIO EN GESTIÓN DE
LA SEGURIDAD Y CALIDAD ALIMENTARIA

Dña. Sandra Espeleta Valera

D. José Manuel Barat Baviera

D. Raúl Grau Melo

D. Samuel Verdú Amat

Curso Académico 2015-2016
VALENCIA, 1 de Julio del 2016



MONITORIZACIÓN DE LA ESTABILIDAD DE ZUMO DE NARANJA PASTEURIZADO MEDIANTE LENGUA ELECTRÓNICA POTENCIOMÉTRICA.

Espeleta Valera, Sandra; Barat Baviera, José M.; Grau Melo, Raúl; Fuentes Pérez, Esteban; Verdú Amat, Samuel

RESUMEN:

En el presente trabajo se ha evaluado la capacidad de la lengua electrónica para el control de la calidad de zumo de naranja pasteurizado en los que puede existir un riesgo de desarrollo de bacterias esporuladas. Para ello, se llevaron a cabo análisis físico-químicos, microbiológicos, así como medidas con las lenguas electrónicas. Se dispuso un zumo de naranja previamente inoculado con *Alicyclobacillus acidoterrestris* y *Alicyclobacillus hesperidum* y se dejó evolucionar durante 25 días. El pH y los °Brix no mostraron variaciones significativas en el tiempo. La concentración de ácidos totales y de ácido ascórbico presentaron un descenso progresivo a lo largo del período de almacenamiento evidenciándose así el deterioro sufrido durante los días de estudio. Estos parámetros además del crecimiento microbiano se relacionaron con la respuesta voltamétrica del zumo. Para ello se llevaron a cabo dos tipos de análisis multivariante, el Análisis de Componentes Principales (PCA), más concretamente MSPC (Multivariate Statistical Process Control) y el análisis de Mínimos Cuadrados Parciales (PLS). Mediante el método MSPC se consiguió diferenciar todas las muestras respecto de la muestra a día 0 considerándolas diferentes estadísticamente. En el modelo obtenido con el PLS para el ácido ascórbico, los valores predichos se ajustaron a los valores reales lo que confirma el potencial de la lengua voltamétrica en la evaluación del deterioro del zumo de naranja pasteurizado.

PALABRAS CLAVES: Lengua electrónica, voltimetría de pulsos, zumo de naranja, análisis físico-químico, análisis microbiológico.

ABSTRACT:

The aim of this work was to evaluate the use of the electronic tongue to control the quality of pasteurized orange juice in which there may be a risk of developing of sporulated bacteria. For this purpose, physical-chemical and microbiological analyses, as well as measurement with the electronic tongue were carried out. pH and °Brix did not show significant differences throughout the storage time. Concentrations of total acids and ascorbic acid exhibited a gradual decrease during the storage, showing the spoilage that samples underwent throughout the days of study. These parameters and microbial growth were related to the voltammetric response of orange juice. For this purpose, two types of multivariate analysis, the Principal Component Analysis (PCA), more specifically MSPC (Multivariate Statistical Process Control) and

analysis of Partial Least Squares (PLS) were carried out. By MSPC method it was able to distinguish between all samples and the sample at day 0 considering different statistically. In the models obtained with PLS for ascorbic acid, predicted values successfully fitted to the experimental values, which would confirm the potential of the voltammetric tongue in the evaluation of spoilage of pasteurized orange juice.

KEY WORDS: electronic tongue, pulse voltammetry, orange juice, physico-chemical analysis, microbiological analysis.

1. INTRODUCCIÓN

El zumo de frutas se define según el Real Decreto 781/2013, de 11 de octubre, como el producto susceptible de fermentación, pero no fermentado, obtenido a partir de las partes comestibles de frutas sanas y maduras, frescas o conservadas por refrigeración o congelación, de una o varias especies mezcladas, que posea el color, el aroma y el sabor característicos del zumo de la fruta de la que procede. En el que se podrán restituir el aroma, la pulpa y las células que procedan de la misma especie de fruta.

La Asociación Europea de Productores de Zumos (AIJN) en su informe sobre el consumo de zumos y néctares en la Unión Europea situó el consumo total de estos productos en la Unión Europea en 9.702 millones de litros en 2014.

AIJN ha cuantificado el mercado español de zumos y néctares en el año 2014, en 968 millones de litros. Este volumen situaría a nuestro país, con casi un 10% del mercado total europeo de zumos y néctares solo por detrás de Alemania, Francia y Reino Unido.

Dentro de la industria agroalimentaria, el sector de los zumos y néctares mantiene una fuerte importancia y presencia en el mercado exterior. En 2014, se exportaron 791.547 toneladas, con un valor de económico de 613,50 millones de euros, un -6,9% menos que en 2013 en valor, pero un 6% más en volumen. Por sabores, el zumo de naranja con un volumen de 259.804 toneladas fue el sabor más vendido en el exterior (ASOZUMOS, 2016).

La industria alimentaria generalmente emplea diferentes métodos físicos, químicos o una combinación de ambos para el control del deterioro de los alimentos o la proliferación de microorganismos patógenos. El procesado industrial de alimentos utiliza la pasteurización para garantizar la calidad y seguridad de los alimentos mediante la destrucción de células vegetativas, sin embargo, este proceso tiene un efecto letal muy limitado sobre endoesporas. Esta baja letalidad sobre las endoesporas se suele asumir ya que su efecto sobre la seguridad alimentaria es bajo en alimentos ácidos como los zumos de frutas, en los que es muy común utilizar la pasteurización como método de conservación. Sin embargo, la aparición de especies del género *Alicyclobacillus*; microorganismos alterantes que son capaces de sobrevivir a la pasteurización, supone un serio desafío a los problemas de calidad en la industria del zumo de fruta (Adewunmi et al. 2016).

La presencia de esporas de *Alicyclobacillus acidoterrestris* en zumos de frutas y zumos concentrados es un problema significativo para la industria del zumo. Estas bacterias no patógenas, gram positivas, aerobias, acidófilas, termófilas y esporuladas causan deterioros del tipo agriado plano en zumos comerciales pasteurizados, lo que se atribuye a la producción de metabolitos de olor desagradable. La alteración producida por *A. acidoterrestris* es difícil de detectar visualmente, en general el zumo alterado tiene un aspecto normal, puede aparecer una pequeña sedimentación, pero en ningún caso formación de gas. Los cambios que se producen en la calidad en los zumos contaminados los hacen deficientes e imbebibles, lo que resulta en la pérdida de su valor en el mercado y por tanto provoca importantes pérdidas económicas dentro de la industria (Chang y Kang, 2004).

La monitorización en muchos procesos de producción alimentaria en los que algunos parámetros químicos varían en el tiempo es clave para cumplir con las normas de control de calidad, un ejemplo típico son los procesos de fermentación en alimentos y bebidas. La aplicación de este control en continuo es interesante dentro del proceso productivo de los zumos para evitar desviaciones debidas a la contaminación microbiológica o averías del sistema.

Sin embargo, solo unos pocos parámetros (pH, O₂, T, etc.) pueden ser fácilmente monitorizados in situ, mientras que tanto para realizar un buen control sobre el proceso como para llevar a cabo una toma de decisiones adecuada se requiere más información. Esta información está basada en datos obtenidos a través del muestreo periódico, que, además supone una pérdida de tiempo desde que se toma la muestra hasta que se obtienen los resultados finales (Peris y Escuder, 2013).

Un método ideal para el control de procesos, en este caso la alteración del zumo, aunque es extensible a cualquier otro proceso, debe permitir la determinación rápida, precisa y exacta de forma directa de varios compuestos de interés, con una preparación mínima o sin preparación de las muestras. Los sensores químicos pueden ser una alternativa adecuada, debido principalmente a sus características como la instrumentación relativamente simple, los bajos precios, la mínima preparación de muestras y una fácil automatización de las mediciones. (Peris y Escuder, 2013).

En este sentido, uno de los enfoques más prometedores es la utilización de sistemas químicos multisensor (en lugar de sensores discretos). Estos sistemas químicos multisensor son conocidos como narices electrónicas y lenguas electrónicas.

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 procesado 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 procesado 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).

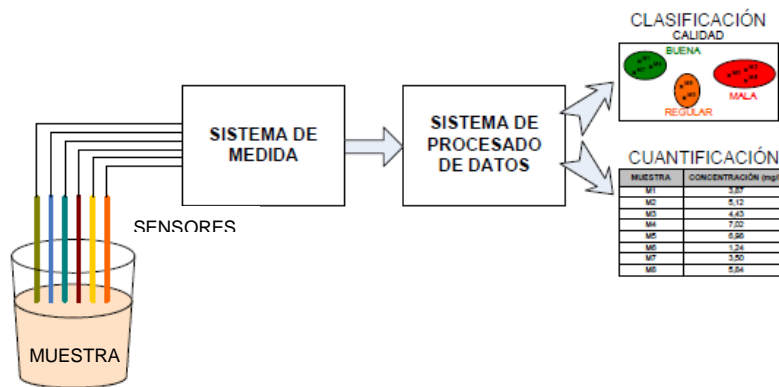


FIGURA 1. Estructura de la lengua electrónica (Alcañiz, 2011)

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).

Las lenguas electrónicas se están volviendo más y más populares como técnicas objetivas automatizadas no destructivas para caracterizar sabores desarrollados en los procesos que se llevan a cabo en la industria alimentaria. Sin embargo, cabe destacar que hay mucha investigación aún por realizar, especialmente con respecto a la tecnología de sensores.

Así, en el presente trabajo se establece como objetivo evaluar la capacidad de la lengua electrónica (voltametría de pulsos), para el control durante los primeros estadios, de la calidad de zumo de naranja pasteurizado en los que puede existir un riesgo de desarrollo de bacterias esporuladas.

2. MATERIAL Y MÉTODOS.

2.1. Materia prima.

En el presente estudio se utilizó zumo de naranja envasado en tetrabrik adquirido en un supermercado local.

Para el inóculo del zumo se utilizaron las cepas puras de los microorganismos *Alicyclobacillus acidoterrestris* (CECT: 7094) y *Alicyclobacillus hesperidum* (CECT: 5324) de la Colección Española de Cultivos Tipo (Universidad de Valencia, Burjassot, Valencia). Las cepas se adquirieron en forma de liofilos.

2.2. Preparación de las muestras.

Para la realización del estudio, el zumo una vez mezclado de forma homogénea, fue inoculado con las cepas. Para ello estas tuvieron que ser reconstituidas.

Para la reconstitución de las cepas liofilizadas, el contenido de cada vial se vertió en un tubo de agua destilada estéril para proceder a la suspensión de los microorganismos. Seguidamente se realizó una siembra por extensión en agar PDA (Liofilchem®, Italia) y se incubó 4 días a 50°C. De las colonias crecidas en las placas sembradas se volvió a realizar una siembra por extensión y se incubó en las mismas condiciones. De estas segundas placas sembradas por extensión se sembraron placas de PDA utilizando la técnica de triple estría para obtener así colonias aisladas. Las condiciones de incubación fueron 72h a 50°C. Se seleccionaron colonias aisladas de cada uno de los microorganismos y se inocularon en tubos de PDB (Scharlau Chemie®, Barcelona, España) previamente acidificados con una disolución al 0,01% de ácido cítrico, siendo el pH final del medio de cultivo 2,88. Los tubos se incubaron 48h a 50°C, obteniéndose la suspensión de microorganismos para ser inoculados.

Para la inoculación de los zumos, de cada uno de los tubos, uno con *A. acidoterrestris* y otro con *A. hesperidum*, se pipetearon la proporción de 1mL de cada para 3L de zumo, siendo la carga microbiana inicial de la muestra de 18 UFC/ml de zumo.

Una vez los zumos fueron inoculados se incubaron a 50°C durante el tiempo de estudio, tomándose muestra a los días 0 (tras la siembra), 1, 2, 7, 9, 16, 20 y 25 (Wibowo et al., 2015).

2.3. Determinaciones microbiológicas

El desarrollo de *Alicyclobacillus acidoterrestris* y *Alicyclobacillus hesperidum* en el zumo se determinó por el procedimiento de dilución seriada en agua destilada estéril y siembra en placa (ICMSF, 2000). La siembra se realizó en la superficie de placas Petri con agar PDA (Liofilchem®, Italia), que se incubaron a 50°C durante 48 horas en condiciones de aerobiosis. Se trabajó siempre en condiciones asépticas (material esterilizado y en campana de flujo laminar).

2.4. Determinaciones físico-químicas

Todas las determinaciones descritas en este apartado se realizaron, al menos por triplicado, para un zumo control y para el zumo inoculado en el transcurso de diferentes días.

2.4.1. DETERMINACIÓN DEL pH

El pH de las muestras se midió directamente sobre las muestras empleando un pH-metro digital (Crison basic 20, Spain), en condiciones de temperatura ambiente.

2.4.2. DETERMINACIÓN DE LOS GRADOS BRUX

Los °Brix se determinaron mediante la medida en un refractómetro digital (modelo RFM330, Bellingham & Stanley Limited, Reino Unido) a una temperatura constante de 20°C. El resultado obtenido se expresó como °Brix (g de sólidos solubles/100 ml zumo).

2.4.3. DETERMINACIÓN DE LA ACIDEZ TOTAL

La determinación de la acidez total de las muestras expresada como la concentración de ácido cítrico en el zumo (g. de ácido cítrico en 100mL de zumo de naranja) se calculó mediante análisis volumétrico. Se valoraron 10mL de muestra utilizando como valorante una disolución 0,1N de hidróxido de sodio (NaOH), y fenolftaleína como indicador (Wang et al., 1994). Puesto que la muestra tiene un color naranja y la fenolftaleína vira a un color fucsia, el viraje se detecta por la aparición de un incremento de la intensidad del color naranja (de un naranja pálido a un naranja más intenso o vivo).

2.4.4. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO ASCÓRBICO

La concentración de ácido ascórbico (g. de ácido ascórbico en 100mL de zumo de naranja) se determinó mediante análisis volumétrico. Se valoraron 20mL de muestra utilizando como valorante una disolución de yodo 0,012M, añadiendo a la muestra 1mL de ácido clorhídrico (HCl) 15% v/v y 1mL de una disolución de almidón de patata 1% p/v que actúan como indicador (Ciancaglini et al., 2001). El viraje se detecta por la aparición de una tonalidad verde parduzca en la muestra de zumo.

2.5 Medidas con el equipo de voltimetría (lengua electrónica)

El ensayo se realizó con el equipo FraPlusMini diseñado y elaborado por el Instituto de Reconocimiento Molecular y Desarrollo Tecnológico de la Universidad Politécnica de Valencia. Este equipo está constituido por una aplicación informática, que permite configurar el equipo y administrar los

resultados obtenidos; un potenciostato, o dispositivo de medición que permite la variación de potencial en los electrodos, un sensor compuesto a su vez por cuatro electrodos de trabajo de metales nobles (Ir, Rh, Pt, Au), encapsulados en un cilindro de acero inoxidable que funciona como contraelectrodo. Los electrodos se encuentran conectados al potenciostato y dispuestos en una celda, de forma que la muestra en este caso zumo de naranja entra en contacto directo con los electrodos, para poder aplicar el tren de pulsos configurado en el software. En el estudio el tren de pulsos en mV aplicado fue de 0, 200, 0, 600, -500, 0, 400, -750, 0, 750, 150 y 0 mV durante un intervalo de tiempo de 20 ms cada uno.

Tras cada muestra fue necesaria la limpieza de los electrodos puesto que durante las medidas se producen reacciones de oxidación, reducción, corrosión, etc. que forman una capa residual sobre ellos que ha de ser eliminada después de cada medida, sin alterar la superficie del electrodo, para evitar variaciones de la señal en los ensayos posteriores. La limpieza la lleva a cabo el equipo de manera automática, se trata de una limpieza electroquímica.

2.6 Análisis estadístico.

Con el objetivo de comprobar la existencia de diferencias significativas para cada día de toma de muestra los diferentes análisis fisicoquímicos y microbiológicos, se realizaron análisis de la varianza (ANOVA simple) utilizando el programa Statgraphics Centurion XVI. I

Para evaluar la capacidad de la lengua electrónica como método para la caracterización de zumos pasteurizados en los que se inicia el desarrollo de bacterias esporuladas se llevaron a cabo dos tipos de análisis multivariante realizaron Análisis de Componentes Principales (PCA), más concretamente MSPC (Multivariate Statistical Process Control) y el análisis de Mínimos Cuadrados Parciales (PLS).

El MSPC es un método derivado del UCP (Univariate Control Process) y ofrece la posibilidad de incluir un gran número de variables y las interacciones entre ellas al mismo tiempo. El objetivo de MSPC es crear un modelo, basado en las características de las muestras, que las caracteriza, así como unos umbrales (límites) de confianza, lo que determina la conformidad de nuevas muestras de acuerdo con las especificaciones preestablecidas (Bersimis, Psarakis, y Panaretos, 2007). El uso del modelo se basa en la inclusión de nuevos datos multivariados (de nuevas muestras) y la evaluación de la distancia de la respuesta de las nuevas muestras, obtenidas a partir del modelo, mediante el estudio de Q-estadística (Q-residuals). La situación de la respuesta del modelo dentro de los límites de confianza indica que las muestras están dentro de requisitos preestablecidos, es decir iguales a las que han generado el modelo. Por el contrario, las muestras fuera de los límites de confianza implican que algo en ellas produce la desviación de los resultados del modelo (muestras diferentes a las que generaron el modelo). Así cualquier Q-residual, obtenido tras el tratamiento de nuevas muestras por el modelo, superior al límite establecido por el control representa que el modelo es incapaz de reconocerlas como muestra control y por tanto se pueden interpretar como diferentes a este dado que

presentarán alguna irregularidad en las variables originales que impiden la identificación y por tanto quedan separadas del control (Verdu et al., 2016).

En segundo lugar, se hicieron análisis de mínimos cuadrados parciales (PLS) que maximizan la correlación entre variables independientes (señal de corriente) y dependientes (variables fisicoquímicas y microbiológicas) (Martens & Martens, 2001). El objetivo es generar modelos matemáticos que permitan expresar relación en los cambios observados en las medidas voltamétricas y los obtenidos mediante los análisis fisicoquímicos y microbiológicos. Para tal fin dos tercios de las muestras se utilizaron para el desarrollo y crovalidación del modelo matemático y el tercio restante para la validación de este (predicción).

La bondad del modelo y de la predicción se evaluó a partir de los valores del coeficiente de regresión (R^2), de la desviación del modelo por el cálculo de la raíz de mínimos cuadrados (RMSE) y del Bias, tanto para la calibración (C), crovalidación (CV), como de la predicción (P).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Determinaciones microbiológicas y físico-químicas

Tras la inoculación de 3 litros de zumo de naranja con 1mL de caldo con *Alicyclobacillus acidoterrestris* cuya concentración era de $9 \cdot 10^4$ UFC/mL y con 1mL de caldo con *Alicyclobacillus hesperidum* cuya concentración era de $1,7 \cdot 10^4$ UFC/mL la carga microbiana inicial resultante en el zumo de naranja (mix de ambas bacterias) fue de 18 UFC/mL.

La figura 2 muestra el crecimiento de la carga microbiana durante el estudio. Como se puede observar existió un crecimiento exponencial característico, alcanzándose el máximo de crecimiento a los 3 días, manteniéndose constante la carga microbiana ($5,4 \log \text{ ufc/mL}$ zumo) durante el resto del ensayo. Valores similares fueron obtenidos por Roig et al. en su estudio (2015) donde se utilizaba una temperatura de incubación de 43°C .

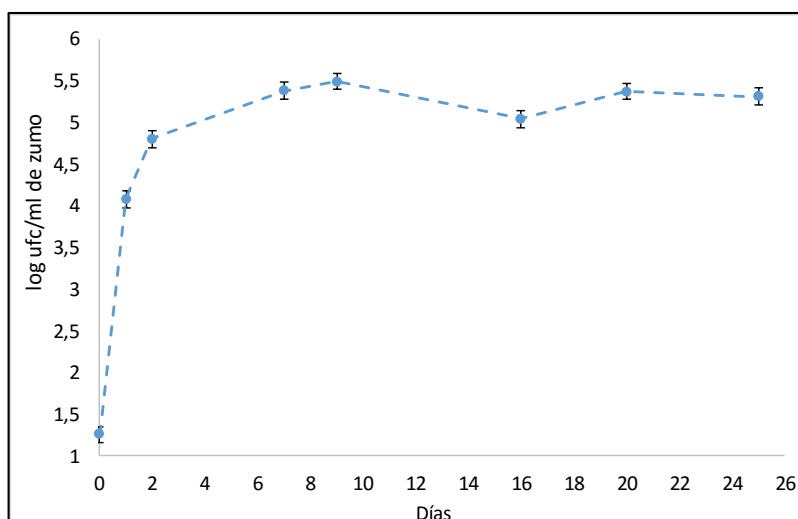


FIGURA 2. Curva de crecimiento microbiano para una mezcla de *Alicyclobacillus acidoterrestris* y *Alicyclobacillus hesperidum* en zumo de naranja incubado a 50°C durante 25 días. Barras expresan error estándar.

La determinación del pH, así como la determinación de los grados Brix no mostraron ninguna evolución significativa en el tiempo. El desarrollo de las cepas de *Alicyclobacillus* no parece afectar a estos dos parámetros. Las mediciones de pH obtuvieron una media de 3,60 con una desviación estándar de 0,05. En el caso de los grados Brix la media obtenida fue de 11,51g de sólidos solubles/100 ml zumo con una desviación estándar de 0,09. Estudios previos como los realizados por Merle (2012) y los realizados por Chang y Kang. (2004) observaron el mismo comportamiento.

La acidez total expresada como gramos de ácido cítrico en 100mL de zumo de naranja parece describir una tendencia hacia la disminución de la concentración de ácido cítrico en el lapso de tiempo estudiado, pese a que esta disminución es muy pequeña (Figura 3). Si bien las diferencias durante los primeros 9 días no son significativas, es a partir del noveno día cuando se produce un descenso más marcado, alcanzando un valor final de 2.25 ± 0.03 g/mL de zumo.

Así mismo, el ácido ascórbico muestra la misma tendencia, una disminución de la concentración a lo largo del tiempo (Figura 3), si bien esta bajada es mucho más acusada que la mostrada por el ácido cítrico, posiblemente por la facilidad de oxidación que presenta este ácido en presencia de oxígeno. En efecto, la presencia del oxígeno disuelto en el zumo y el presente en el espacio de cabeza pueden ser factores que oxiden el ácido durante los primeros estadios de la conservación del zumo (Wibowo et al., 2015). Cabe mencionar que los datos para los 3 primeros días desde la inoculación del microorganismo o bien no presentaron diferencias significativas entre ellos (valores día 0 y 1) o bien estas fueron muy pequeñas (valores día 0 y 2), siendo estos días de vital importancia para la detección precoz del deterioro del zumo. Si en esta primera etapa somos capaces de detectar pequeñas desviaciones respecto a los valores esperados de diferentes parámetros como puede ser en este caso la concentración de ácido ascórbico, es posible atajar el incremento de estas desviaciones y evitar que

aumenten hasta un punto en el que el producto ya no sea apto para su comercialización y, en consecuencia, evitar pérdidas económicas.

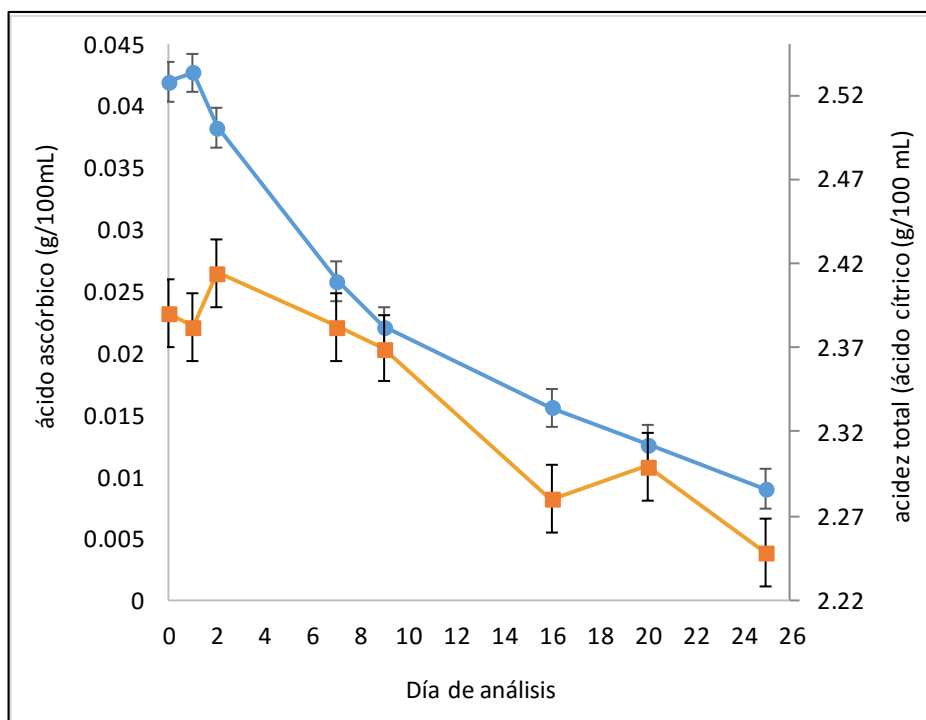


FIGURA 3. Evolución de la concentración de ácido ascórbico (●) expresada en gramos/100mL de zumo de naranja y de la concentración de ácido cítrico (■) expresada en gramos/100mL de zumo de naranja. Barras expresan error estándar.

3.3 Evaluación de la degradación del zumo 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. El primer estudio se basó en evaluar la respuesta obtenida cada día de análisis con la finalidad de poder obtener un modelo matemático que sea capaz de discriminar las muestras a día 0. Para ello se utilizó la herramienta estadística MSPC (Multivariate Statistical Process Control). Mediante este método se obtiene un modelo matemático que caracteriza las muestras a día 0 en base a su respuesta voltamétrica y todas aquellas muestras cuya respuesta voltamétrica sea lo suficientemente diferente como para que al aplicarle el modelo el Q-residual que se obtenga sea suficientemente elevado como para considerarlo diferente al de la variabilidad de las muestras a día 0, son consideradas como diferentes. Así, como se aprecia en la figura 4, todas las muestras se consideran diferentes estadísticamente a la del día 0, pues los Q-residuals para cada una de ellas son estadísticamente superiores al valor límite (línea roja discontinua en la figura 4).

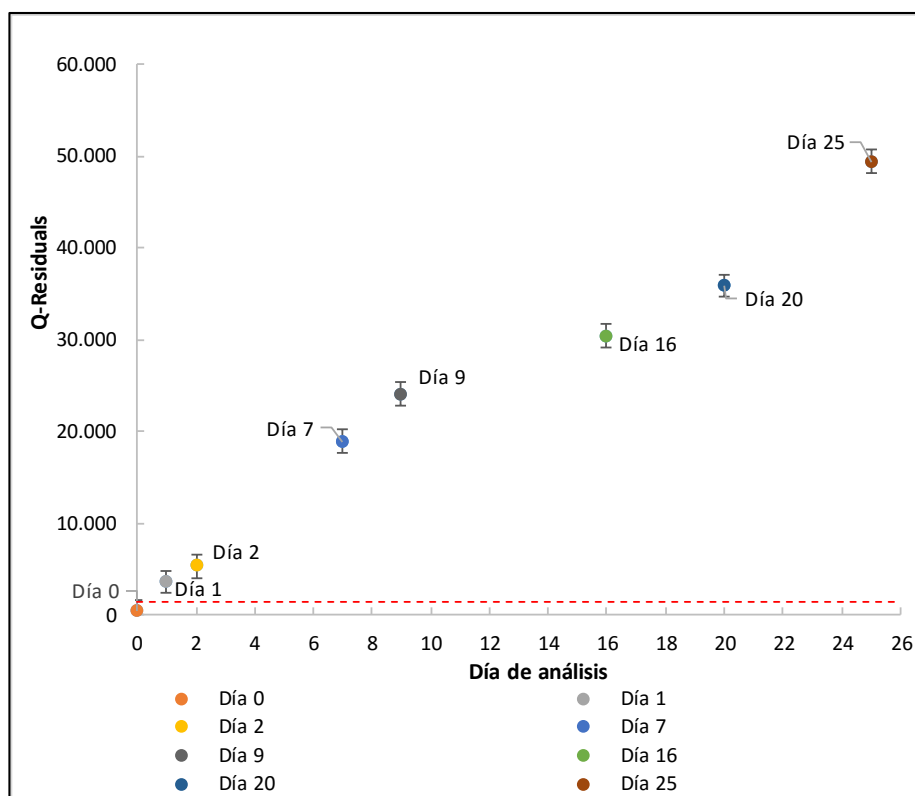


FIGURA 4. Resultado de los Q-residuals para el estudio del día de análisis. Barras expresan error estándar.

Una vez evaluada la capacidad del equipo para diferenciar las muestras a día 0 se procedió al estudio de la posible relación existente entre las variables fisicoquímicas y microbiológicas evaluadas y la respuesta voltamétrica obtenida. Dado que de los ensayos realizados solo la acidez total, el desarrollo microbiano y la concentración en ácido ascórbico presentaron evolución con el tiempo, el análisis de relación se realizó solo sobre los valores de estos tres. Para tal fin se utilizó el análisis multivariante PLS que no solo nos muestra la posible relación, sino que nos establece un modelo matemático de predicción de la variable evaluada. En la tabla 1 se muestran los resultados del análisis. Como se observa, tanto para la acidez total como para el desarrollo microbiano, los modelos matemáticos obtenidos mostraron valores de coeficiente de regresión relativamente buenos ($R^2= 0,868$ y $R^2= 0,890$ respectivamente), sin embargo, los valores de los parámetros Bias y REMSE reflejan una baja bondad de los ajustes. Como se puede observar en la figura 5, en la que a modo de ejemplo se muestra la relación entre los valores reales y los predichos para el desarrollo microbiano, el modelo genera una predicción errónea que hace que los valores obtenidos se desvíen de la recta $x=y$, es decir observados igual a predichos.

Por el contrario, los resultados obtenidos para el ácido ascórbico mostraron la gran relación existente entre la concentración de este y la respuesta voltamétrica, obteniéndose valores muy buenos para la bondad del modelo de predicción (RMSEP: 0,0019702; P Bias: -0,000780494 y $R^2P: 0,981$). En la figura 6 se muestra los valores de ácido ascórbico medidos químicamente frente a los

predichos por el modelo. Como se puede observar, la linealidad y el ajuste a la recta X=Y fue total.

TABLA 1. Resultados de la validación del modelo PLS para el modelo matemático de predicción del crecimiento microbiano, de la concentración en ácidos totales y la de ácido ascórbico.

Resultados PLS			
	log ufc	acidez total	ácido ascórbico
Núm. LVs	6	3	3
RMSEC	0,0265396	0,00826669	0,000618429
Bias	8,88178E-16	4,44089E-16	6,93889e-018
R ² Cal	0,999	0,981	0,997
RMSECV	0,638848	0,0211646	0,00184397
CV Bias	0,0361428	-0,000292267	-0,00028740
R ² CV	0,684	0,890	0,986
RMSEP	0,414022	0,0226139	0,0019702
P Bias	0,0527448	-0,00663637	-0,000780494
R ² P	0,890	0,868	0,981

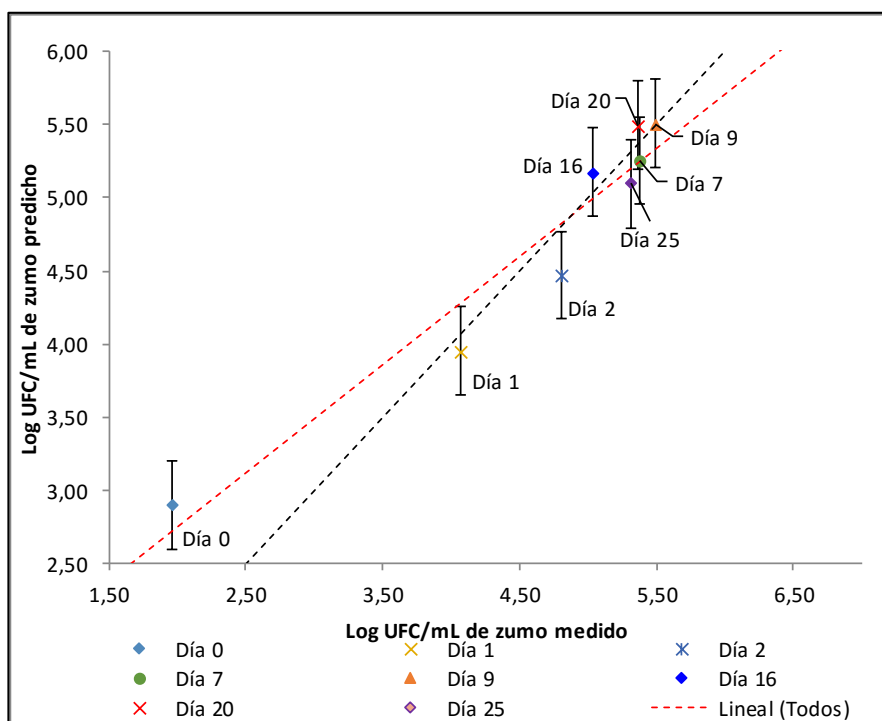


FIGURA 5. Ajuste lineal de los valores de crecimiento microbiano (log UFC/mL de zumo) medidos vs predichos por el modelo PLS. Barras expresan error estándar.

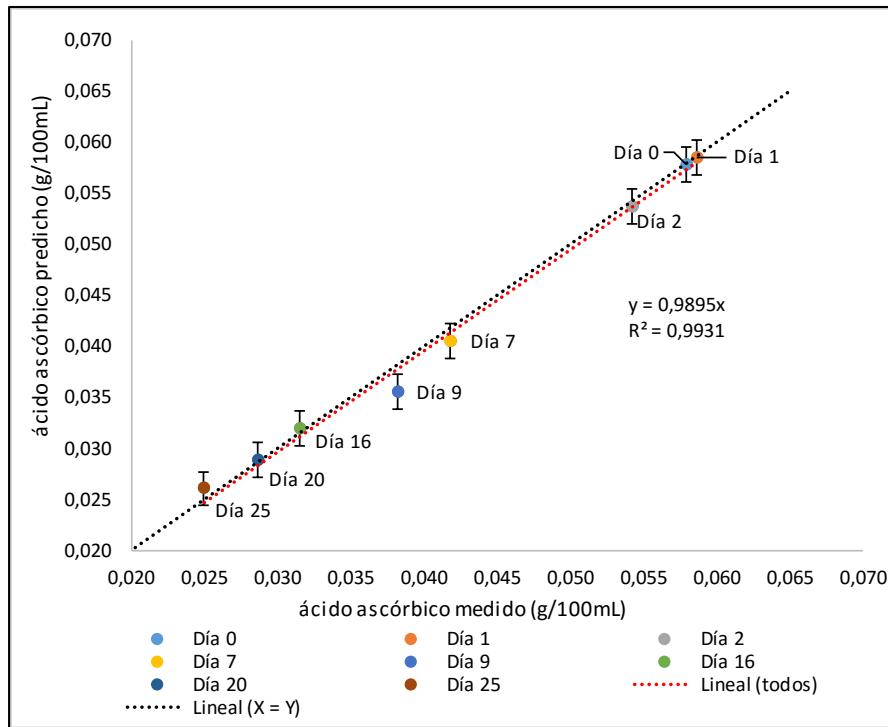


FIGURA 6. Ajuste lineal de los valores de ácido ascórbico medidos vs predichos por el modelo PLS. Barras expresan error estándar.

La figura 7A muestra la respuesta voltamétrica, a modo de ejemplo, para los días 0, 9 y 25 de análisis y la figura 7C el ratio de selectividad para el desarrollo del modelo matemático de predicción del ácido ascórbico. Como se puede observar los mayores valores de selectividad (información más influyente) se obtuvieron para los electrodos platino y oro en los pulsos en los que se aplicó un potencial de 600 y 750 mV. Esta respuesta puede estar relacionada con potenciales redox (Bubulica et al., 2012) los cuales tienen lugar en la superficie del metal e incrementan cuando incrementa el potencial aplicado. Bubulica et al., (2012) observaron un pico anódico alrededor de los 450 a 750 mV los cuales relacionaron con la capacidad antioxidante de extractos de plantas medicinales. Pisoschi et al., (2011), evaluando zumos de fruta, observaron un pico a los 530 mV, utilizando como electrodo de trabajo Pt. Resultados similares fueron también encontrados por Esch, Friend, and Kariuki (2010). Baldeón et al., (2015) encontraron picos alrededor de los 500 – 900 mV, al igual que Adriana et al. (2013) a los 570 mV, ambos trabajando con un electrodo de Au, los cuales fueron relacionados con ácido ascórbico.

Si bien como se ha mostrado en la tabla 1 y en la figura 6 existe una gran relación entre la concentración en ácido ascórbico del zumo y la respuesta voltamétrica definida por el ratio de selectividad, para la clasificación por día no solo fue esta información voltamétrica definida la que generó el modelo de caracterización de las muestras a día 0, sino que existió otra adicional. En efecto, el modelo de predicción de ácido ascórbico no diferencia entre la concentración a día 0 y 1 puesto que es la misma (figura 2). En cambio, el modelo que caracteriza las muestras a día 0 sí diferencia entre muestras a día 0 y a día 1. Si observamos la figura 7B, en la que se muestran las cargas (loadings) de las variables, es decir el peso de las variables en el modelo de clasificación que han

hecho que se generen los Q-Residuals observados en la figura 4, para la clasificación por día la información utilizada es la misma que la utilizada en el modelo de predicción del ácido ascórbico más otra adicional que se produce a los voltajes de -500 y -700 mV en los tres electrodos Rh, Pt y Au. Hay que destacar que para ninguno de los estudios el electrodo de iridio mostró efecto alguno, es por ello por lo que no se presenta su voltagrama en la figura 7.

Estos resultados muestran las ventajas de las lenguas electrónicas, en las que se combina la información de varios electrodos no específicos, donde esta combinación es capaz de generar la huella voltamétrica de una sustancia (Alcañiz et al., 2012), bien en este caso para la clasificación de las muestras a partir del día 0 o para la determinación de la concentración de ácido ascórbico.

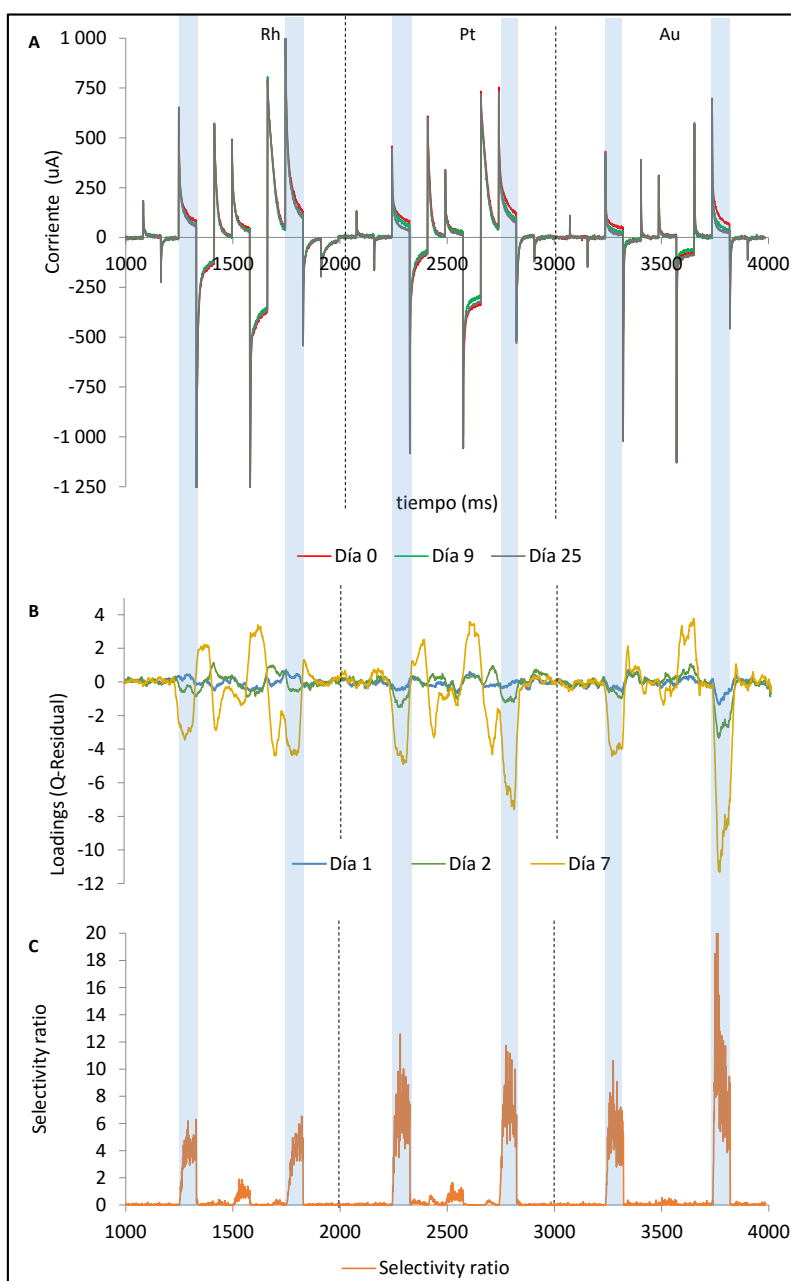


FIGURA 7. Respuesta voltamétrica para los días 0, 9 y 25 de análisis (A), Q-Residuals del análisis MSPC para los días 1, 2 y 7 (B) y ratio de selectividad para el desarrollo del modelo matemático de predicción del ácido ascórbico (C).

4. CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos mediante la herramienta estadística MSPC (Multivariate Statistical Process Control) mostraron que el equipo voltamétrico es capaz de diferenciar todas las muestras respecto de la muestra a día 0, considerándolas diferentes estadísticamente. Por lo tanto, es capaz de discriminar entre una muestra de zumo inicial no alterada de otra que ha sufrido algún tipo de cambio.

Por otro lado, mediante el análisis multivariante PLS se observó una clara relación entre la concentración de ácido ascórbico y la respuesta voltamétrica, obteniéndose valores muy buenos para la bondad del modelo de predicción. Así la lengua, mediante el modelo matemático establecido, puede ser una herramienta para evaluar la concentración en ácido ascórbico presente en un zumo.

Finalmente, el estudio ha mostrado la eficacia de las lenguas en general, en las que la combinación de la información procedente de electrodos no específicos traza la huella voltamétrica, en este caso del zumo, de forma que no solo se evalúa un parámetro, por ejemplo, ácido ascórbico, sino que también otras variables que pueden permitir, como es el caso, la diferenciación entre días en los que el ácido ascórbico no ha variado.

Si bien se han podido establecer conclusiones, sería interesante llevar a cabo nuevas experiencias en las que se ralenticen los cambios producidos durante los primeros días de ensayo, modificando las condiciones de la experiencia (menor temperatura de incubación, mayor número de medidas...), así como realizar análisis de otros parámetros que puedan verse afectados por el crecimiento bacteriano como podría ser la concentración de guayacol (producto resultante del metabolismo de las especies de *Alicyclobacillus*) con el fin de poder establecer nuevas correlaciones con la respuesta voltamétrica de los zumos.

5. REFERENCIAS

- Adewunmi, B., Witthuhn C.R., Albertyn, J., Oguntoyinbo, F.A. (2016). Culture dependent and independent genomic identification of *Alicyclobacillus* species in contaminated commercial fruit juices. *Food Microbiology* 56, 21-28.
- Adriana, V., Grosan, C., Muresan, L. M., Pruneanu, S., & Olenic, L. (2013). Modified gold electrodes based on thiocytosine/guanine-gold nanoparticles for uric and ascorbic acid determination. *Electrochimica Acta*, 88, 839-846.
- 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.
- Alcañiz, M., Vivancos, J.-L., Masot, R., Ibañez, J., Raga, M., Soto, J., & Martínez-Mañez, R. (2012). Design of an electronic system and its application to electronic tongues using variable amplitude pulse voltammetry and impedance spectroscopy. *Journal of Food Engineering*, 111(1), 122–128.
- Asociación española De fabricantes de zumos [en línea]. (ASOZUMOS). El mercado y sus cifras. URL: <www.asozumos.org>. [Consulta: 14 Jun. 2016].
- Baldeón E.O, Alcañiz M, Masot R, Fuentes E.M, Barat J.M, Grau R. (2015). Voltammetry pulse array developed to determine the antioxidant activity of camuecamu (*Myrciaria dubia* (H.B.K.)

- McVaug) and tumbo (*Passiflora mollissima* (Kunth) L.H. Bailey) juices employing voltammetric electronic tongues. *Food Control*, 54, 181-187.
- Bersimis, S., Psarakis, S. & Panaretos, J. (2007). Multivariate statistical process control charts: an overview. *Quality and Reliability Engineering International*.
- Bevilacqua, M., Bucci, R., Magrì, A. D., Magrì, A. L., & Nescatelli, R. (2013). Chapter 5 – Classification and class-modelling. In F. Marini (Ed.), *Data handling in science and technology – Chemometrics in food chemistry* (Vol. 28, pp. 171–233). Elsevier.
- Bubulica, M., Chirigiu, L., Grumezescu, A., Popescu A., Simionescu, A. (2012). Screening of antioxidant potential of *Lonicera tatarica*, *Viburnum opulus* and *Sambucus ebulus* L. by multiple in vitro assays. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6 (3), 544 - 552.
- Ciancaglini, P., Santosa H. L., Daghashtanli, K., Thedei G., (2001). Using a classical method of vitamin C quantification as a tool for discussion of its role in the body. *Biochemistry and Molecular Biology Education* 29,110-1 14
- Chang, S.S., Kang, D.H., (2004). *Alicyclobacillus spp.* in the fruit juice industry. History, characteristics, and current isolation/detection procedures. *Crit. Rev. Microbiol.* 30, 55-74.
- Comisión Internacional de Especificaciones Microbiológicas para los Alimentos (ICMSF). (2006). *Guía simplificada para el entendimiento y uso de Objetivos de Inocuidad de los Alimentos y Objetivos de Rendimiento*
- E.O, Alcañiz M, Masot R, Fuentes E.M, Barat J.M, Grau R. (2015). Voltammetry pulse array developed to determine the antioxidant activity of camuecamu (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) *McVaug*) and tumbo (*Passiflora mollissima* (Kunth) L.H. *Bailey*) juices employing voltammetric electronic tongues. *Food Control*, 54, 181-187.
- Esch, J. R., Friend, J. R., & Kariuki, J. K. (2010). Determination of the vitamin C content of conventionally and organically grown fruits by cyclic voltammetry. *International Journal of Electrochemical Science*, 5, 1464-1474.
- European Fruit Juice Association (AIJN), 2015. *Liquid Fruit, Market Report*
- Gutés, A.; Céspedes, F.; Del Valle, M. (2007). Electronic tongues in flow analysis. *Analytica Chimica Acta*, 600, 90-96.
- Martens, H., & Martens, M. (2001). *Multivariate Analysis of Quality. An Introduction*. John Wiley & Sons, Inc.
- Merle. J. (2012). Growth behavior of *Alicyclobacillus acidoterrestris* as a function of strain and culture conditions
- Peris, M., Escuder, L., -(2013). On-line monitoring of food fermentation processes using electronic noses and electronic tongues. *Analytica Chimica Acta* 804, 29-36.
- Pisoschi, A. M., Pop, A., Negulescu, G. P., & Pisoschi, A. (2011). Determination of ascorbic acid content of some fruit juices and wine by voltammetry performed at Pt and carbon paste electrodes. *Molecules*, 16, 1349-1365.
- Roig A.X, Asto, E., Engers, I., Hernandez, M.M. (2015). Improving the efficiency of ultra-high pressure homogenization treatments to inactivate spores of *Alicyclobacillus spp.* in orange juice controlling the inlet temperature. *Food Science and Technology* 63, 866-871.
- Verdú S, Vásquez F, Grau R, Ivorra E, Sánchez A.J, Barat J.M. (2016). Detection of adulterations with different grains in wheat products based on the hyperspectral image technique: the specific cases of flour and bread. *Food Control*, 62, 373–380.
- Wang, L.W., Yang, H.Z., Jiang, D., 1994. SB/T 10203-94: General Test Method for Fruit Juice. Ministry of Commerce of the People's Republic of China, Beijing.
- Wibowo S, Grauwet T, Santanina Santiago J, Tomic J, Vervoort L, Hendrickx M, Van Loey A. (2015). Quality changes of pasteurised orange juice during storage: A kinetic study of specific parameters and their relation to colour instability. *Food Chemistry*, 187, 140–151.