

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

APLICACIÓN DE LA VOLTAMETRÍA DE PULSOS EN LA DETECCIÓN DE LA PRESENCIA DE JARABES EN MIEL DE GIRASOL

TRABAJO FIN DE MÁSTER UNIVERSITARIO EN CIENCIA E
INGENIERÍA DE LOS ALIMENTOS

ALUMNA: Cora Cavero Carbonell

TUTOR/A ACADÉMICO: M^aIsabel Escriche Roberto
COTUTOR: Juan Soto Camino
DIRECTOR EXPERIMENTAL: Román Bataller Prats

Curso Académico: 2015-2016

VALENCIA, 29 de Junio de 2016

APLICACIÓN DE LA VOLTAMETRÍA DE PULSOS EN LA DETECCIÓN DE LA PRESENCIA DE JARABES EN MIEL DE GIRASOL.

Cavero Carbonell, C.; Bataller Prats, R.; Camino Soto, J.; Escriche Roberto, I.

RESUMEN

Evaluar la presencia de adulterantes en la miel es de gran importancia para el sector apícola a nivel mundial. Las técnicas clásicas que se están utilizando para este fin son de alto coste y los resultados obtenidos con ellas en ocasiones no son concluyentes. Entre las técnicas alternativas que recientemente se están proponiendo para detectar adulteraciones en alimentos, destacan las lenguas electrónicas, ya que son métodos económicos y que se pueden aplicar en línea a los procesos industriales.

Por ello, el objetivo de estudio ha sido aplicar una lengua electrónica voltamétrica para la detección de presencia de jarabes como adulterantes en la miel de girasol. Para ello se evaluó la incorporación de varios tipos de jarabes: arce, cebada, arroz, arroz integral, maíz y caña, en una miel monofloral (girasol). Además, se estudiaron diferentes porcentajes de adición jarabe/miel: 2,5/97,5; 5/95; 10/90; 20/80; 40/60. En general se observa una evolución de la respuesta de la lengua electrónica en relación al porcentaje de adulterante, que es más evidente para el jarabe de arroz integral y de caña. Se han obtenido buenas correlaciones para adulteraciones mayores al 10%, pero no para valores inferiores a este porcentaje.

Los resultados obtenidos han demostrado que la lengua electrónica voltamétrica es una técnica prometedora para la detección de adulteraciones, sin embargo, se debe seguir ajustando el sistema para conseguir detectar porcentajes menores al 10% de adulterante.

RESUM

Avaluar la presència de adulterants en la mel és de gran importància per al sector apícola a nivell mundial. Les tècniques clàssiques que s'estan utilitzant per a aquesta finalitat són d'alt cost i els resultats obtinguts amb elles en ocasions no són concloents. Entre les tècniques alternatives que recentment s'estan proposant per detectar adulteracions en aliments, destaquen les llengües electròniques, ja que són mètodes econòmics i que es poden aplicar en línia als processos industrials.

Per això, l'objectiu de l'estudi ha estat aplicar una llengua electrònica voltamètrica per a la detecció de presència de xarops com adulterants en la mel de gira-sol. Per tal de dur-ho a terme, es va avaluar la incorporació de diversos tipus de xarops: auró, ordi, arròs, arròs integral, blat de moro i canya, en una mel mono-floral (gira-sol). A més, es van estudiar diferents percentatges d'adulteració xarop/mel: 2,5/97,5; 5/95; 10/90; 20/80; 40/60. En general s'observa una evolució de la resposta de la llengua electrònica en relació al

percentatge de adulterant, que és més evident per al xarop d'arròs integral i canya. S'han obtingut bones correlacions per adulteracions majors al 10%, però no per a valors inferiors a aquest percentatge.

Els resultats van concloure que es tracta d'una tècnica prometedora per a la detecció d'adulteracions, pel fet que es pot distingir de forma qualitativa i quantitativa la quantitat de adulterant que s'ha afegit, tot tenint en compte que de cara al futur s'hauria d'estudiar l'ajust de la seva precisió per a percentatges menors al 10% de adulterant, optimitzant així el procés.

ABSTRACT

Assessing the presence of adulterants in honey is of great importance for the apiculture sector worldwide. Classical techniques that are used for this purpose are high cost and the results obtained with them are sometimes inconclusive. Among the alternative techniques that are proposed to detect adulteration in food are the electronic tongues, as they are cheaper methods that may be applied online to industrial processes.

Therefore, the objective of this study is to apply a voltammetric electronic tongue for detecting the presence of syrups; maple, barley, rice, brown rice, corn and sugarcane as adulterants in a single-flower honey (sunflower). For this, the incorporation of various types of syrups was assessed. In addition, different percentages of syrup/honey were studied: 2,5/97,5; 5/95; 10/90; 20/80; 40/60. Overall, an evolution of the response of the electronic tongue on the percentage of adulterant is observed, which is more evident for wholegrain rice and cane syrup. Good correlations have been obtained for adulterations above 10%, but not for lower percentages.

The results concluded that it is a promising technique for detecting adulterations, because it can distinguish qualitatively and quantitatively the amount of adulterant that has been added. Considering that, future studies should set more accuracy for lower percentages than 10% of adulterant, in order to optimize process.

Palabras clave: Lengua electrónica, voltametría de pulsos, miel, adulteración.

1. INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas la detección de la adulteración de la miel ha sido un gran desafío. La adulteración se ha utilizado para incrementar los beneficios económicos añadiendo miel de baja calidad o jarabes durante el proceso de producción. (Wang et al., 2014).

Según el Código Alimentario Español, se considera como 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”* (R.D. 2484/1967).

La miel es un edulcorante con alto valor nutricional y comercial, sabor único y un precio superior al de otros edulcorantes como el azúcar de caña o el jarabe de maíz. (Qiu P. et al., 1999).

La adulteración de la miel puede producirse por la adición de jarabes de azúcar a la miel pura, o bien por alimentar con azúcar a las abejas durante el flujo del néctar. Este tipo de miel recibe el nombre de “miel adulterada” ya que no se puede considerar como miel pura, debido a los cambios que ha sufrido. Existe además, otra forma de adulterarla 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).

Hasta ahora se han utilizado diversas técnicas analíticas con el fin de detectar la adulteración de la miel: (Simsek et al., 2012); LC-ECD (cromatografía líquida con detección electroquímica), FTIR, ATR (Transformada de Fourier de la Radiación Infrarroja-Reelectancia atenuada total) (Sivakesava&Irydayaraj, 2001) para la cuantificación y detección de jarabe de maíz añadido, GC/MS (cromatografía de gases/espectroscopía de masas) (Padovan et al., 2003) y EA-IRMS a través de la reacción isotópica del $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ (analizador elemental-espectroscopía de masas de relación isotópica) HR-NMR (alta resolución-Resonancia magnética nuclear) para la detección de mieles adulteradas con jarabes de azúcar (Bertelli et al., 2010).

En la actualidad, en el sector agroalimentario, la lengua electrónica es una técnica prometedora debido a que se trata de una técnica de menor coste y más rápida respecto a las anteriormente comentadas. Inicialmente esta técnica se aplicaba sobre alimentos líquidos, por ejemplo para clasificar diversos tipos de bebidas como vinos, cervezas, cafés, leches y zumos de fruta (Schreyer y Mikkelsen, 2000), clasificar cervezas de distintas marcas entre rubias y negras (Arrieta et al., 2010) y para el análisis de té (Ivarsson et al., 2001). Con respecto a la detección de adulteraciones en alimentos, las lenguas electrónicas han sido utilizadas, para la detección de adulteraciones como leche de oveja con leche de vaca (Días et al., 2009).

Las lenguas electrónicas se pueden definir como la combinación de un conjunto de sensores de sensibilidad cruzada que, junto con una herramienta de reconocimiento de patrones, puede clasificar ciertos parámetros (Gutés et al., 2007).

Las técnicas más utilizadas dentro del campo de la lengua electrónica son la potenciometría y la voltametría (cíclica o de pulsos). El objetivo de una medición potenciométrica es obtener información acerca de la composición de la muestra analizada mediante el potencial que aparece entre dos electrodos, uno de trabajo y otro de referencia, cuando estos se sumergen en una

disolución y no hay circulación de corriente. El objetivo de la voltametría es aplicar una tensión controlada a la interfaz electrodo-disolución del electrodo de trabajo y medir la corriente que circula por el mismo. Esta corriente se obtiene cuando las especies redox activas se oxidan o reducen. El potencial se puede aplicar como escalones de potencial (voltametría de pulsos) o como barrido de potencial (voltametría cíclica). Para aplicar este método se utilizan tres electrodos: (1) Electrodo de trabajo, sobre el que se realizan las mediadas (se le aplica una tensión controlada y se mide la corriente que circula por él); (2) Electrodo de referencia debe ser muy estable a los cambios de concentración en la disolución y además no se debe producir circulación de corriente por él. (3) Electrodo auxiliar: Su función es permitir la circulación de la corriente hacia el electrodo de trabajo. (Alcañiz, 2011).

Por lo anteriormente comentado, el objetivo de este trabajo ha sido aplicar una lengua electrónica basada en la voltametría de pulsos para la detección de la presencia de jarabes como adulterantes en la miel de girasol.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Materia prima

En este trabajo se utilizó miel de girasol de la empresa Melazahar (Montroy, Valencia) y diferentes jarabes alimentarios: ágave (Natural Bioaprica, España), arce (Maple Joe, Canadá), cebada (Finestra Cielo, Italia), caña (Ingenio Nuestra Señora del Carmen, España), arroz integral (Mitoku Macrobiotic, Japón), arroz (Finestra Cielo, Italia) y maíz (Roquette Laisa S.A., España).

2.2 Diseño de experimentos

La Tabla 1 muestra la humedad de las muestras expresada en gH₂O/100g muestra, así como el diseño de experimentos de los diferentes ensayos realizados combinando la miel con los jarabes a diferentes niveles de adulteración. Se analizó la miel sin adulterar, los diferentes jarabes puros y los diferentes niveles de adulteración (desde 2,5% hasta 40% de adulterante).

Con el objetivo de eliminar la interferencia del contenido en agua de la muestra, el peso de la muestra objeto de análisis se consideró en base seca. En este sentido para cada determinación analítica se pesaban 8g de muestra en base seca (miel, jarabes o combinación de ellos).

TABLA 1. Diseño de experimentos

		Miel girasol	Caña	Arroz	Ágave	Arce	Maíz	Cebada	Arroz Integral
Humedad (g H₂O/100g)		17,5	18,9	18,9	23,3	36,6	16,2	18,5	16,6
Nivel adulteración									
Miel girasol g/100g	Jarabes g/100g	g muestra / 8g base seca							
100	0	12,93	-	-	-	-	-	-	-
0	100	-	13,15	12,72	13,91	16,81	12,72	13,08	12,79
97,5	2,5	12,61	0,33	0,33	0,35	0,42	0,32	0,33	0,32
95	5	12,28	0,66	0,66	0,70	0,84	0,64	0,65	0,64
90	10	11,64	1,32	1,32	1,39	1,68	1,27	1,31	1,28
80	20	10,34	2,63	2,63	2,78	3,36	2,55	2,62	2,56
60	40	7,76	5,26	5,26	5,56	6,73	5,09	5,24	5,12

2.3. Lengua electrónica

El sistema de lengua electrónica (Figura 1) utilizado fue diseñado por el Centro de Reconocimiento Molecular y Desarrollo Tecnológico (IDM) de la Universidad Politécnica de Valencia (UPV). Dicho sistema, consta de un equipo de medida de voltametría FraPlusMini(Alcañiz, 2011), un software para el análisis multivariante de los datos y cuatro electrodos de trabajo de metales nobles (Ir, Rh, Pt y Au). Los electrodos estaban encapsulados en una resina epoxi en el interior de un cilindro de acero inoxidable. Se utilizó también un electrodo de referencia de calomelanos.

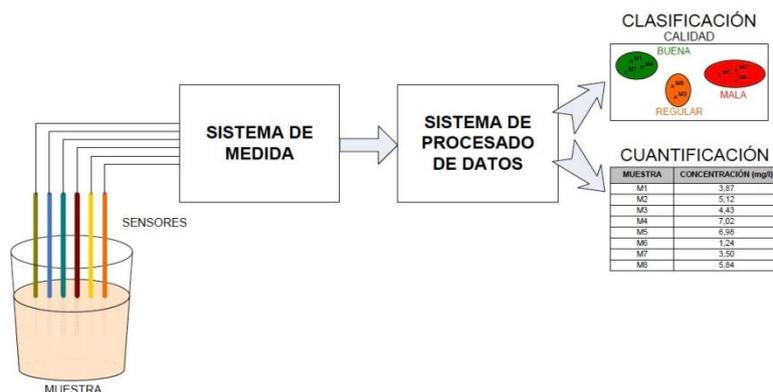


FIGURA 1. Estructura lengua electrónica (Alcañiz, 2011)

En la Figura 2 se observa como ejemplo el patrón de pulsos utilizado por la lengua electrónica para el electrodo de Rh. Este patrón está formado por una serie de pulsos consecutivos crecientes desde 200 mV en 200mV hasta alcanzar el potencial máximo de 1000mV, que se hizo disminuir posteriormente hasta alcanzar un potencial mínimo de -1000mV, separándose cada uno de los escalones que forma el patrón por un retorno a potencial nulo.(0; 200; 0; 400; 0; 600; 0; 800; 0; 1000; 0; 800; 0; 600; 0; 400; 0; 200; 0; 0; 0; -200; 0; -400; 0; -600; 0; -800; 0; 1000; 0; 800; 0; 600; 0; 400; 0; -200, 0, 0). Se aplicaban 40 pulsos, cada uno con una duración de 50 ms, esto daba la señal de respuesta correspondiente de la disolución patrón. Cada uno de los cuatro electrodos muestra una señal de respuesta a este patrón de pulsos.

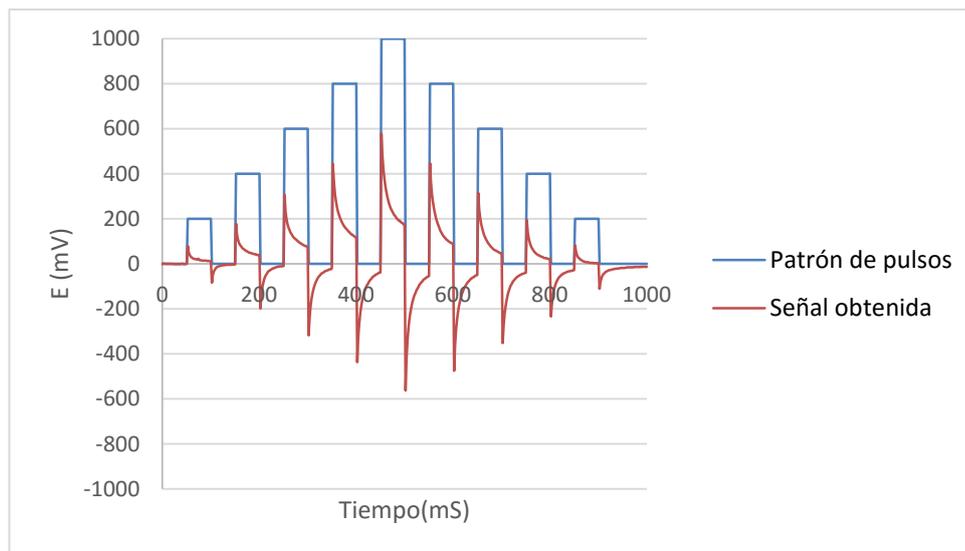


FIGURA 2. Patrón de pulsos

Antes de llevar a cabo la medida de cada muestra se realizaba una limpieza exhaustiva de los electrodos, para evitar que durante las medidas se produjeran reacciones de oxidación, reducción y corrosión que pudieran afectar a la superficie del electrodo. El proceso de limpieza automatizado constaba de una primera etapa de lavado y enjuague de la celda, seguido por un pulido electroquímico realizado en primer lugar con NaOH. A continuación tenía lugar una segunda fase de decapado de los electrodos empleando ácido nítrico 0,1M, finalizando la limpieza con un enjuagado con agua destilada.

2.4. Análisis estadístico

Para analizar los resultados obtenidos, se han utilizado dos técnicas multivariantes: Análisis de Componentes Principales (PCA) y mínimos cuadrados parciales (PLS), con el programa SoloWorkspace. Para realizar el PLS, el 66% de las medidas de las muestras se utilizaron para la calibración y el 33% para validar el modelo obtenido.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Figura 3 muestra como ejemplo el comportamiento de la señal obtenido al aplicar el correspondiente potencial a una muestra de miel de girasol, jarabe de caña puro y la mezcla de ambos. Se observa una clara diferenciación entre las señales obtenidas en estas muestras, lo que confirma que la técnica voltamétrica aplicada es capaz de distinguir la miel del jarabe y de sus mezclas. Este hecho hizo interesante el análisis de la respuesta electroquímica de la miel con diferentes tipos de aditivos, así como el intento de cuantificación de su presencia.

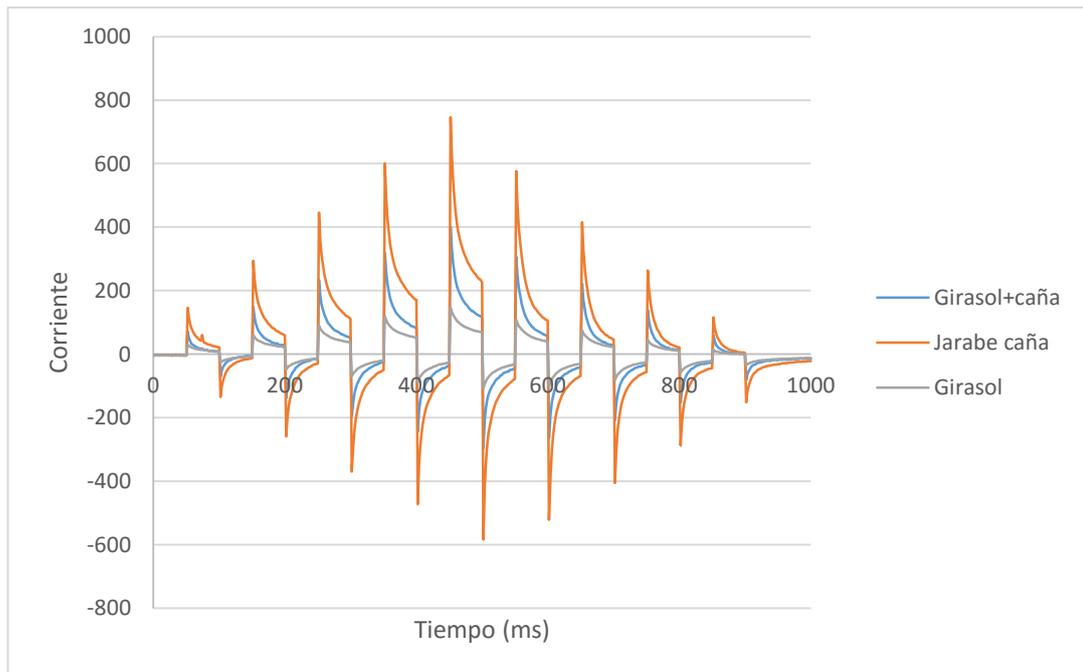


FIGURA 3. Trazas electroquímicas de la secuencia de escalones de potencial para la miel de girasol, jarabe de caña y una de sus mezclas.

En la Figura 4 se representa el análisis de componentes principales (PCA) de las trazas electroquímicas obtenidas para la miel de girasol y los diferentes jarabes estudiados. En ella se observa una buena repetitividad para casi todos los casos estudiados. Atendiendo a la ubicación de cada muestra, los jarabes que más se diferencian de la miel son el de caña, arce, cebada y arroz integral situados en el cuadrante derecho. Los jarabes más semejantes a la miel aunque bien diferenciados entre si son arroz, ágave y maíz, siendo el más afín a ella el arroz debido su proximidad a ella.

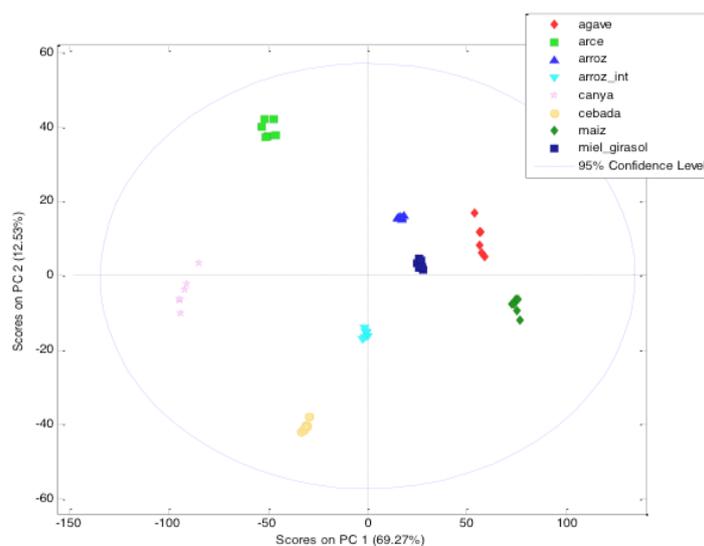


FIGURA 4. PCA miel y jarabes puros.

Las figuras 5, 6 muestran los análisis de componentes principales obtenidos a partir de los datos generados de las medidas voltamétricas para los jarabes objeto de estudio (caña, arroz integral, ágave y arce, maíz, arroz, cebada) con sus diferentes niveles de adulteración (2,5%, 5%, 10%, 20%, 40%). En general, se observa una evolución en la respuesta en relación al porcentaje, que es más evidente para el jarabe de arroz integral y caña.

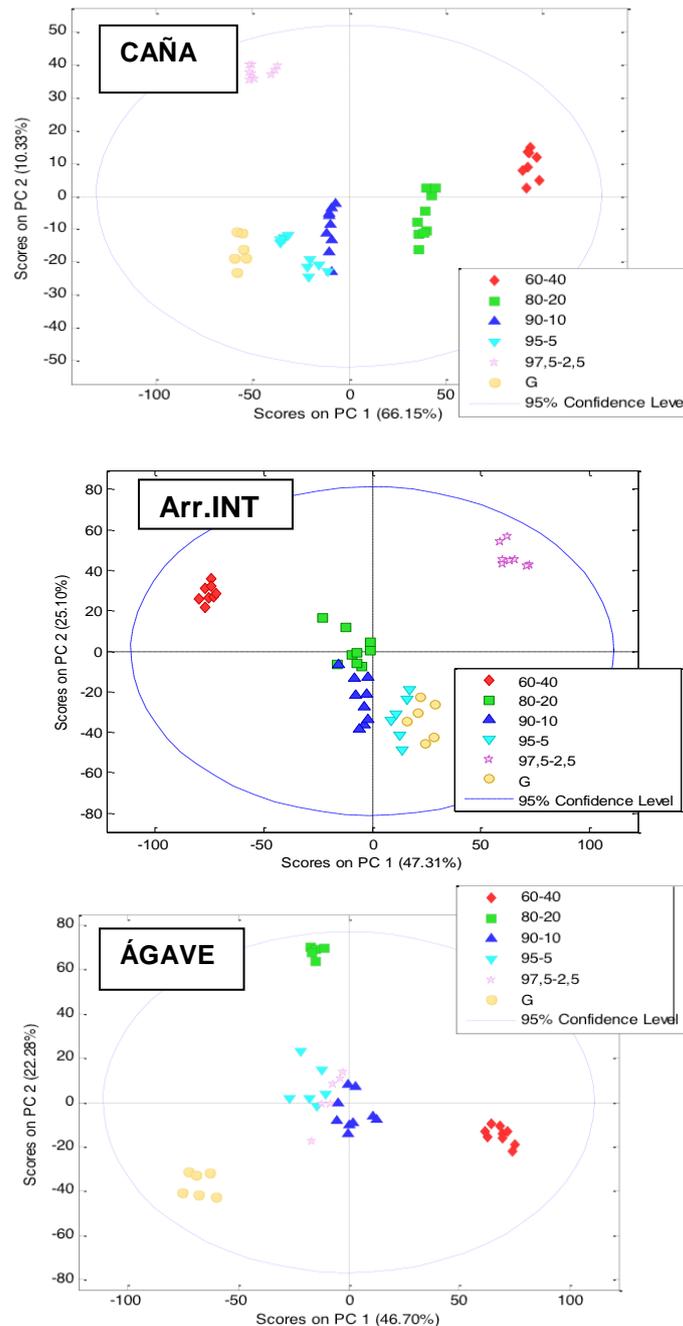


FIGURA 5. PCA adulteraciones con jarabes de caña, arroz integral y ágave.

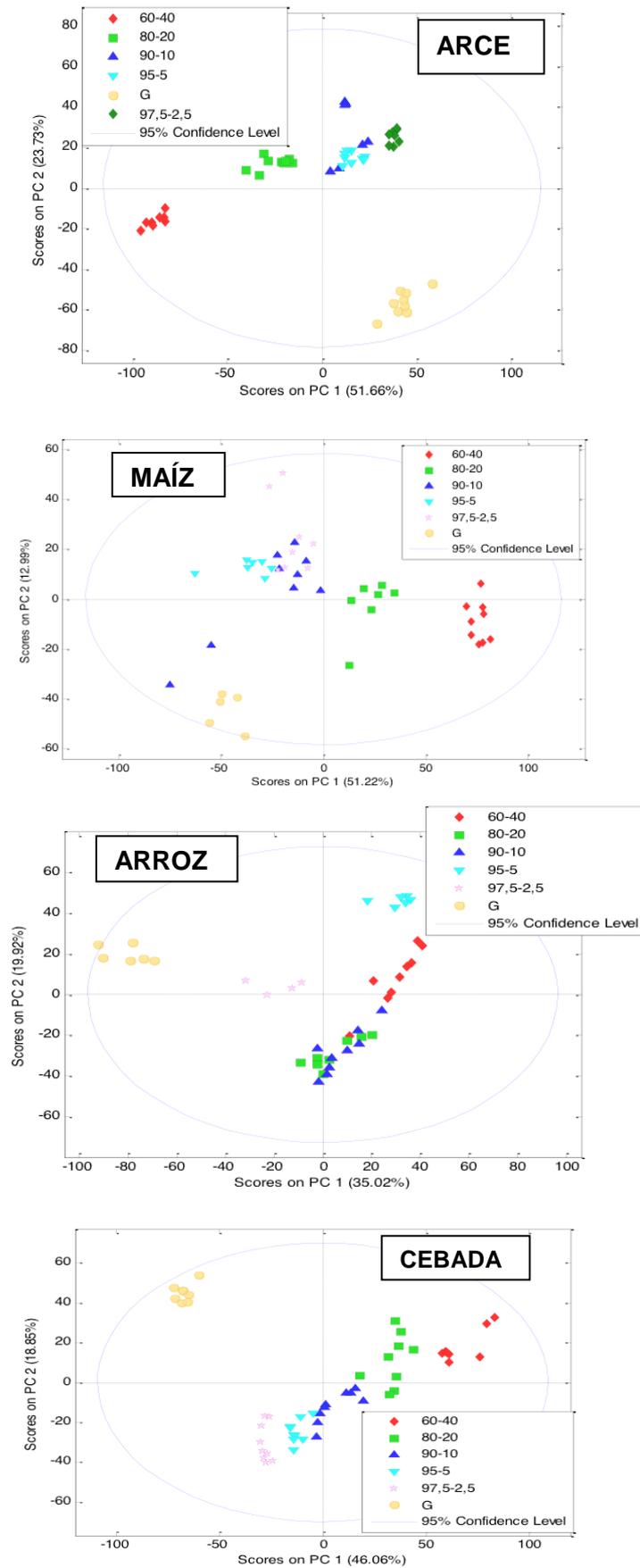


FIGURA 6.PCA adulteraciones con jarabe de arce, maíz, arroz y cebada.

Analizando, como ejemplo, la imagen correspondiente al jarabe de caña se observa que los dos componentes principales explican el 76,48% de la variabilidad de los datos, correspondiendo el PC1 al 66,15% y el PC2 al 10,33%. La figura muestra que los datos están ordenados según magnitud creciente de adulterante de izquierda a derecha, según su nivel de adulteración de 2,5% a 40% de acuerdo con la componente principal 1 (PC1). Sin embargo, el primer nivel de adulteración (2,5%) aparece desplazado en relación a la componente 2 (PC2) sugiriendo la potencial capacidad de esta técnica para evaluar niveles inferiores de adulterante.

La técnica de PCA muestra que se puede distinguir de forma cualitativa el porcentaje de aditivo añadido sobre la miel aunque en ocasiones no se muestre la evolución de una forma ordenada. Esto es debido a que esta técnica potencia la separación grupal de los datos en base a sus diferencias y similitudes. Por lo tanto para realizar la cuantificación del agente añadido se utilizó la técnica de análisis estadístico de mínimos cuadrados parciales (PLS).

En la Tabla 2 se muestran los resultados correspondientes a la validación de los modelos PLS generados para la miel y cuatro tipos diferentes de jarabes. Los valores para el coeficiente de correlación, tanto el predicho, el de validación cruzada como el de calibración están cerca de 1. Esto indica que se puede predecir correctamente la concentración de jarabe adicionado con este método.

TABLA 2. Resultados de la validación de los modelos PLS.

MUESTRA	VARIABLES LATENTES	RMSEC	RMSECV	RMSEP	R²(CAL)	R²(CV)	R²(PRED)
Girasol+Arr. integral	3	3,1698	4,4374	1,577	0,949	0,903	0,991
Girasol+Caña	7	0,62127	1,6691	0,95433	0,998	0,988	0,989
Girasol+Arce	5	2,0671	4,0647	2,9658	0,980	0,923	0,943
Girasol+Maíz	6	2,4139	5,177	2,6045	0,966	0,845	0,972

Para ilustrar los comentarios hechos anteriormente, en las Figuras 7 y 8 se muestran las gráficas correspondientes a las concentraciones observadas frente a concentraciones predichas de jarabe adicionado. Se observa que para valores de adulteraciones mayores al 10% la concentración medida y la predicha están bastante correlacionadas, en cambio para valores de adulteración menores al 10%, no se distingue correctamente el porcentaje de adulterante que se ha incorporado a la miel. De esto se deduce que se debería ajustar el sistema para optimizar el proceso para que sea capaz de identificar muestras con menos del 10% de adulterante.

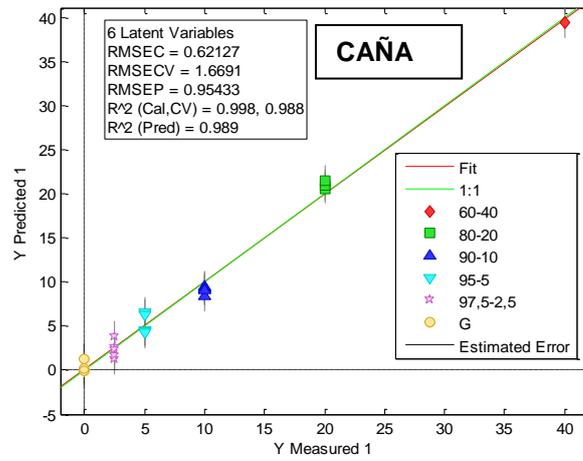
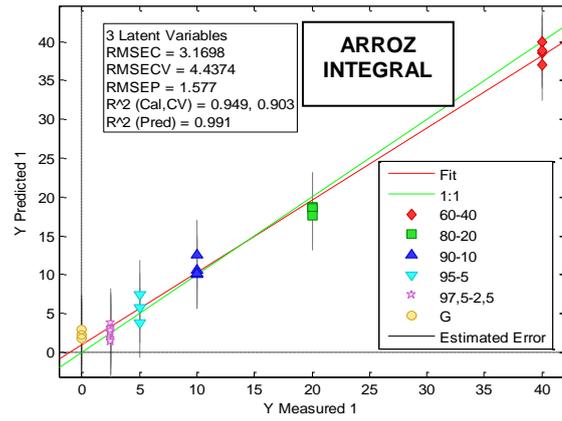


FIGURA 7. PLS jarabes arroz integral y caña.

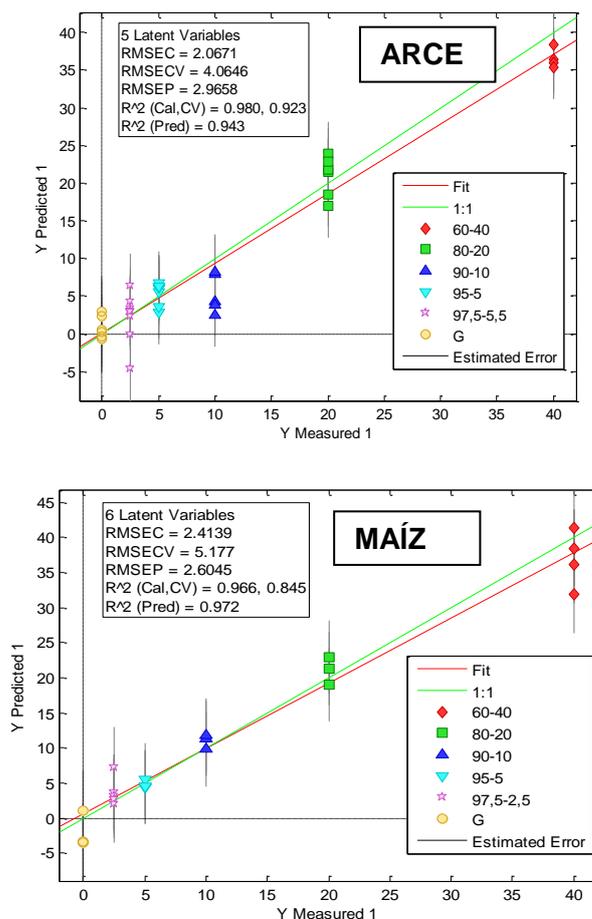


FIGURA 8. PLS jarabes arce y maíz.

4. CONCLUSIONES

La técnica de la lengua voltamétrica, con limpieza automática, permite distinguir de forma cualitativa y cuantitativa los adulterantes añadidos y su cantidad, con la ventaja añadida de que se trata de una técnica rápida.

El análisis multivariante PCA, permitió observar que se puede diferenciar de forma cualitativa el porcentaje de adulterante añadido, mientras que el PLS permitió cuantificar de forma precisa los valores de adulterante contenidos en la miel.

Los resultados son esperanzadores para continuar investigando en esta área de la adulteración en mieles, teniendo en cuenta que se ha de optimizar el proceso para poder cuantificar los porcentajes de adulteración menores al 10%.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alcañiz, M. (2011). Diseño de un sistema de lengua electrónica basado en técnicas electroquímicas voltamétricas y su aplicación en el campo agroalimentario.
- Arrieta, A.; Rodríguez-Menéndez, M.L.; de Saja, J.A.; Blanco, C.A.; Nimubona, D. (2010) Prediction of bitterness and alcoholic strength in beer using an electronic tongue. *Food Chemistry* 123, 642-646.
- 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: 8495-8501
- Decreto 2484/1967, 1967 de 21 de septiembre, por el que se aprueba el texto del *Código Alimentario Español*, BOE número 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: 209-217.
- Gutés, A.; Céspedes, F. & Del Valle, M. 2007. Electronic tongues in flow analysis. *Analytical Chimica Acta*, 600, 90-96.
- Ivarsson, P.; Holmin, S.; Höjer, N.; Krantz-Rülcker, C.; Winqvist, F. (2001). Discrimination of tea by means of a voltammetric electronic tongue and different applied waveforms. *Sensors and Actuators B* 76, 449-454.
- Padovan, G.J.; De Jong, D.; Rodrigues, L.P. & Marchini, J.S., 2003, Detection of adulteration of commercial honey samples by the $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ isotopic ratio, *Food Chemistry*, 82(4):633-636
- Qiu, P; 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*
- Schreyer, S.K.; Mikkelsen, S.R. (2000). Chemometric analysis of square wave voltammograms for classification and quantitation of untreated beverage samples. *Sensors and Actuators B* 71, 147-153.m
- Simsek, A.; Bilsel, M. & Goren, A.C., 2012, $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ pattern of 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):787-792
- Wang, J; Xue, Z; 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