

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS



APLICACIÓN DE LA LENGUA ELECTRÓNICA VOLTAMÉTRICA A ALIMENTOS LÍQUIDOS

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

Esteban Fuentes Pérez

Directores académicos:

Raúl Grau Meló

José Manuel Barat Baviera

Junio de 2017

Agradecimientos

A mis Tutores Raúl Grau y José Manuel Barat por todas las horas dedicadas, por la ayuda, guía y enseñanzas, por su paciencia y entera disponibilidad, por la confianza depositada en mí y estar al pendiente siempre del avance de las diferentes fases desarrollo de la tesis, por la calidez en el trato y la sensación de cercanía.

A Miguel Alcañiz por ayudarnos a encontrar la luz al final de túnel clarificando conceptos y por la gestión para el uso de equipos durante la fase experimental.

A los que conforman el grupo de Investigación por el ambiente de camaradería, a Samu, Francisco y Rafa, por hacer cada día más llevadero en el laboratorio, por todas las historias que quedaron y por las risas, a Cristina y María por las palabras de aliento en la recta final para concluir esta etapa.

A Eli por acompañarme y motivarme para seguir adelante, por tenerme paciencia. A mi familia, en especial a mis padres por ser ejemplo de vida, por apostarse el todo por el todo cuando de mí se trata, por la confianza, por el soporte y el vínculo afectivo incluso con toda la distancia y el tiempo fuera de casa... por siempre estar ahí.

A todos los que han compartido momentos conmigo a lo largo de todos estos años, en especial a mis amigos de pedales con los que disfruto tanto de la montaña, gratitud con todas las personas que de una u otra manera han formado parte de este proyecto de vida.

INDICE GENERAL

	Página
CONTENIDO	
INDICE DE FIGURAS	1
INDICE DE TABLAS	5
RESUMEN	9
INTRODUCCIÓN	17
Tipos de lenguas electrónicas	20
Lenguas electrónicas potenciométricas	20
Lenguas electrónicas impedimétricas	21
Lenguas electrónicas voltamétrica	21
Tipos de Voltametría	23
Tratamiento de datos y Análisis estadístico	25
Análisis de componentes Principales	26
Regresión de mínimos cuadrados parciales	26
REFERENCIAS	29
OBJETIVOS	33
OBJETIVO GENERAL	35
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
CAPÍTULO I:	
INFLUENCIA DE LA AMPLITUD DEL POTENCIAL EN UNA SECUENCIA (TREN) DE PULSOS DE LENGUA ELECTRÓNICA VOLTAMÉTRICA (VET) APLICADA A EVALUAR LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE ALISO	37
RESUMEN	39
INTRODUCCIÓN	39
MATERIALES Y MÉTODOS	44
Preparación de muestras	44
Lengua electrónica Voltamétrica	45
Secuencia de Pulsos	46
Análisis estadístico	48
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	50
Evaluación de las configuraciones de pontenciales	50
Predicción de la capacidad antioxidante del aliso usando modelos Trolox	58
CONCLUSIÓN	62
REFERENCIAS	64
APÉNDICE	69
CAPÍTULO I.I:	
	69

ESTUDIO DE LA SIMILITUD ENTRE DOS CONFIGURACIONES DE PULSOS DE SIMILAR POTENCIAL PERO DE DIFERENTE NÚMERO DE PULSOS TOTALES	
INTRODUCCIÓN	71
MATERIALES Y MÉTODOS	71
Preparación de muestras	71
Análisis Voltamétrico	72
Análisis Estadístico	72
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	72
CONSLUSIONES	74
REFERENCIAS	75
CAPÍTULO II:	
ESTUDIO DE LA APLICACIÓN DE LA LENGUA ELECTRÓNICA VOLTAMÉTRICA AL ANÁLISIS SENSORIAL	
RESUMEN	77
INTRODUCCIÓN	79
MATERIALES Y MÉTODOS	82
Preparación de muestras	82
Determinaciones electrónicas. Voltimetría de pulsos por medio de lengua electrónica	84
Análisis estadístico	84
Estudio de la respuesta voltamétrica para las mediciones realizadas en los 4 sabores básicos	85
Evaluación de la respuesta voltamétrica en función del compuesto	87
Evaluación de las características de sabor de las frutas y café	87
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	88
Estudio de la respuesta voltamétrica para las mediciones realizadas en los 4 sabores básicos	88
Evaluación de la respuesta voltamétrica en función de la concentración	88
Evaluación de la respuesta voltamétrica en función del compuesto	98
Evaluación de las características de sabor de fruta y café	100
CONCLUSIÓN	108
REFERENCIAS	110
CAPÍTULO III:	
APLICACIÓN DEL EQUIPO DE LEV COMO HERRAMIENTA EN LA PRE CARACTERIZACIÓN DE CAFÉ	
RESUMEN	113
	115

INTRODUCCIÓN	116
MATERIALES Y MÉTODOS	120
Materiales	120
Muestras	120
Preparación de muestras	121
Métodos	122
Análisis sensorial	122
Determinación de Color	122
Determinación de pH	122
Determinación de Fenoles Totales (FT)	122
Determinación de sólidos solubles. Índice de refracción (IR)	123
Determinación de la capacidad antioxidante	123
Análisis Voltamétrico por medio de LEV. Caracterización de las respuestas voltamétricas obtenidas	124
Análisis Estadístico	125
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	126
Análisis Sensorial	126
Análisis fisicoquímicos	128
Análisis voltamétrico por medio de LEV/VET	132
CONCLUSIÓN	140
REFERENCIAS	140
CAPÍTULO IV:	
MONITORIZACIÓN DE LA ESTABILIDAD DE ZUMO DE NARANJA PASTEURIZADO MEDIANTE LENGUA ELECTRÓNICA VOLTAMÉTRICA	149
RESUMEN	151
INTRODUCCIÓN	152
MATERIALES Y MÉTODOS	156
Materia Prima	156
Preparación de las muestras	156
Determinaciones microbiológicos	157
Determinaciones Físico químicas	157
Determinación del pH	158
Determinación de los grados Brix	158
Determinación de acidez total	158
Determinación de la concentración de ácido ascórbico	158
Determinaciones Voltamétricas (lengua electrónica)	159
Análisis Estadístico	159
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	161
Determinaciones microbiológicas y físico químicas	161

Determinaciones voltamétricas	165
CONCLUSIÓN	174
REFERENCIAS	175
CONCLUSIONES GENERALES	179

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	Página
Figura I. 1. Matriz de electrodos metálicos: cables de Ir, Rh, Pt and Au	46
Figura I. 2. Señales aplicadas a los electrodos de trabajo de la LEV.	48
Figura I. 3. Respuestas obtenidas por voltametría cíclica de Trolox y Aliso a través de los electrodos de Ir, Rh, Pt and Au.	52
Figura I. 4. Respuesta voltamétrica, para las secuencias de pulsos 50+, 3+, y 4+, sobre los electrodos de Ir y Rh cuando se aplica el pulso de 800 mV y sobre los electrodos de Au y Pt cuando es de 500 mV, en las disoluciones de aliso.	56
Figura I. 5. Respuesta voltamétrica a los 20 ms durante el pulso de 500 mV para el electrodo de Au sobre la muestra de aliso.	57
Figura I. 6. Equivalentes Trolox (mL) observados vs. Predichos para las muestras de Trolox y aliso empleando un modelo de predicción matemática basado en la información voltamétrica de los electrodos nobles o del electrodo de oro	60
Figura I. 7. Valores de Q residuales para los modelos LWR, empleando la secuencia de pulsos 4+.	62
Figura I.I. 1. Comparación de las respuestas voltamétricas obtenidas mediante el tren de pulsos denominado 4+ (0, 200, 500, 800 mV) y el primer segmento de cuatro pulsos obtenido de un tren de pulsos genérico de 22 pulsos.	73
Figura I.I. 2. Comparación de las señales voltamétricas obtenidas para las configuraciones de pulsos 4+ y 3+ sobre las concentraciones de los analitos sujetos de estudio.	74
Figura II. 1. Representación gráfica de la componente principal 1 (PC1) frente a la componente principal 2 (PC2) para el estudio de	89

componentes principales (PCA) de las lecturas voltamétricas realizadas sobre las disoluciones de NaCl.

- Figura II. 2.** Representación del análisis VIP para el sabor salado y de unos de los electrodos más influyentes. 93
- Figura II. 3.** Representación del análisis VIP para el sabor dulce y de unos de los electrodos más influyentes 93
- Figura II. 4.** Representación del análisis VIP para el sabor ácido y de unos de los electrodos más influyente 94
- Figura II. 5.** Representación del análisis VIP para el sabor amargo y de uno de los electrodos más influyente. 95
- Figura II. 6.** Señal extraída del análisis de NaCl durante el pulso de 500mV en el electrodo de Plata. 95
- Figura II. 7.** Representación gráfica de la componente principal 1 frente a la componente principal 2 para el estudio de componentes principales de las lecturas voltamétricas, de los segmentos VIP, realizadas sobre las disoluciones de NaCl. 97
- Figura II. 8.** PCA de los 4 sabores básicos utilizando todos los datos. 100
- Figura II. 9.** Representación gráfica de la componente principal 1 frente a la componente principal 2 para el estudio de componentes principales de las lecturas voltamétricas realizadas sobre los patrones y frutas. 101
- Figura II. 10.** Representación gráfica de la componente principal 2 frente a la componente principal 3 para el estudio de componentes principales de las lecturas voltamétricas realizadas sobre los patrones y frutas. 102
- Figura II. 11.** Representación gráfica de la componente principal 1 frente a la componente principal 2 y PC2 frente a PC3 para el estudio de componentes principales de las lecturas 103

	voltamétricas realizadas sobre los patrones y frutas	
Figura II. 12.	Representación del análisis VIP para el sabor dulce y las frutas camu camu y kiwi.	104
Figura II. 13.	Representación gráfica de la componente principal 1 frente a la componente principal 2 y PC2 frente a PC3 para el estudio de componentes principales realizado solo con las lecturas voltamétricas seleccionadas en los segmentos VIP, realizadas sobre los patrones y frutas.	105
Figura II. 14.	Representación gráfica de la componente principal 1 frente a la componente principal 2, PC2 frente a PC3 y PC3 vs PC4 , para el estudio de componentes principales realizado solo con las lecturas voltamétricas seleccionadas en los segmentos VIP, realizadas sobre los patrones y frutas.	107
Figura II. 15.	Representación del análisis VIP para el sabor salado y el café.	108
Figura III. 1.	Biplot parámetros organolépticos.	128
Figura III. 2.	Biplot parámetros fisicoquímicos.	132
Figura III.3.	Análisis de componentes principales de las lecturas voltamétricas para todas las muestras de café.	133
Figura III. 4.	Caracterización de los cafés en los cuatro sabores básicos a partir de la información obtenida en el Capítulo 2.	135
Figura III. 5.	Representación gráfica de los valores medidos de pH, capacidad antioxidante, uniformidad y puntuación total frente a los predichos al aplicar los modelos matemáticos desarrollados mediante el PLS.	139
Figura III. 6.	Representación del análisis VIP para las variables pH y capacidad antioxidante, así como del tren de pulso aplicado.	139
Figura IV. 1.	Curva de crecimiento microbiano para la mezcla de Alicyclobacillus acidoterrestris y	162

Alicyclobacillus hesperidum en zumo de naranja incubado a 50°C durante 25 días.

- Figura IV. 2.** 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. 164
- Figura IV. 3.** Resultado de los Q-residuals para el estudio del día de análisis. 166
- Figura IV. 4.** Ajuste lineal de los valores de crecimiento microbiano (log UFC/mL de zumo) medidos vs predichos por el modelo PLS. 169
- Figura IV. 5.** Ajuste lineal de los valores de ácido ascórbico medidos vs predichos por el modelo PLS. 170
- Figura IV. 6.** Q-Residuals del análisis MSPC para los días 1 y 2 de análisis 173

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA	Página
Tabla I. 1. Resultados de los modelos generados mediante la regresión localmente ponderada (LWR) para la predicción de aliso, cuando se ha empleado la respuesta voltamétrica de cada uno de los electrodos y la del conjunto de ellos.	59
Tabla II. 1 Propiedades Físico químicas de Kiwi y Camu Camu	83
Tabla II. 2. Resultados obtenidos para el estudio de PCA realizado sobre las lecturas voltamétricas realizadas sobre los 4 sabores básicos.	89
Tabla II. 3. Resultados de los estudios de PLS realizados con la totalidad de la información voltamétrica y los obtenidos para el realizado solo con los datos provenientes de la selección VIP del primer PLS.	91
Tabla II. 4. Resultados obtenidos del análisis de componentes principales de la matriz de datos correspondiente a los 4 sabores analizados utilizando la selección de datos del segmento VIP.	96
Tabla II. 5. Resultados PCA de todos los sabores básicos utilizando todo el voltagrama o solo la información procedente de los VIP's.	99
Tabla III. 1. Resultados de los atributos de las muestras de café evaluados sensorialmente por un panel de cata conformado por expertos. Fragancia/aroma (F/A), sabor (S), sabor residual (SR), acidez (A), cuerpo (C), uniformidad (U), balance (B), taza limpia (TL), dulzor (D) y puntaje del catador (PC).	127
Tabla III. 2. Resultados análisis fisicoquímicos realizados a las muestras. Parámetros de color (L^* , a^* , b^* , C y h), fenoles totales (FT) (mg ácido gálico / g de café molido), pH, índice de refracción (IR),	131

densidad (D) (g/mL) y capacidad antioxidante (CA) (Eq. Trolox (mM)).

- Tabla III. 3.** Valores de correlación PLS obtenidos para los modelos de predicción de las variables fisicoquímicas y sensoriales a partir de la respuesta voltamétrica de la lengua electrónica. 138
- Tabla IV. 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. 168

PRÓLOGO

La importancia de la alimentación alrededor del mundo y por consiguiente la producción y procesamiento de alimentos de calidad a ser ofrecidos a los consumidores demanda cada vez más técnicas y métodos de análisis que se caractericen por su eficacia y efectividad. Por esta razón en los últimos años el desarrollo de nuevas técnicas de análisis de alimentos ha dado como resultado el desarrollo de nuevos protocolos de análisis de alimentos. En la presente tesis se busca aplicar el equipo de Lengua electrónica voltamétrica de pulsos a diferentes campos de la industria alimentaria donde puede ser de muchísima utilidad debido a la simplicidad del equipo, facilidad de uso y capacidad de detección. La tesis se ha estructurado en una introducción donde se explica el fundamento de las lenguas electrónicas y su funcionamiento, además de las herramientas estadísticas requeridas para el respectivo análisis de datos, los objetivos generales y específicos que forman los cuatro capítulos en los que se han estructurados los resultados experimentales y que a continuación se enumeran, así como una conclusión general que resume las descritas en cada uno de los capítulos.

Capítulo 1. Muestras de Aliso (*Alnus acuminata*) a diferentes concentraciones y un patrón químico antioxidante fueron analizados por medio de voltametría cíclica y varias configuraciones de voltametría de pulsos, se buscó determinar la capacidad antioxidante total de las muestras de aliso en base a modelos de predicción a partir del análisis Voltamétrico del trolox.

Apéndice Capítulo1. Puesto a que en el capítulo 1 se estudian diferentes configuraciones de pulsos (potencial y duración), en este apéndice se realizó la comparación entre pulsos con iguales potenciales y duración, pero que

provenían de diferentes configuraciones de pulsos, para conocer si existe un efecto en la respuesta voltamétrica obtenida.

Capítulo 2. Muestras correspondientes a los cuatro sabores básicos fueron testadas por medio de voltametría de pulsos, se caracterizaron sus respectivas señales y posteriormente se analizaron muestras de café y frutas, con la finalidad de encontrar alguna correspondencia entre los sabores y la respuesta electroquímica obtenida y así pre clasificar las muestras de acuerdo a su tipo.

Capítulo 3. Continuando con el análisis sensorial, se realizó una comparación entre los datos obtenidos del análisis sensorial y físico químico de 6 muestras diferentes de café y las respuestas voltamétricas obtenidas mediante el equipo de lengua electrónica, la finalidad de este estudio fue hacer una pre selección de las muestras en base a sus atributos organolépticos.

Capítulo 4. Una nueva versión del equipo de lengua electrónica voltamétrica en el que se implementa un proceso de limpieza electroquímica semi automatizado fue empleado para determinar alteración en la vida útil de zumos de naranja producidos por las bacterias *Alicyclobacillus acidoterrestris* y *Alicyclobacillus hesperidum*.

RESUMEN

RESUMEN

En la actualidad la industria alimentaria se ha convertido en una de las más importantes del mundo, pero no solamente debido a la generación de empleos ni a la contribución del desarrollo de la economía y los mercados internacionales, sino porque es la industria gestora de un producto de primera necesidad para el ser humano.

El Desarrollo de nuevas tecnologías, la publicación de nuevos hallazgos, implementación de nuevos métodos en la industria alimentaria exigen procesos más rápidos, métodos y técnicas de análisis más precisas, versátiles y que en lo posible no demanden de mano de obra especializada que puede ser empleada en tareas más importantes.

Es por ello que se implican campos de la ciencia que pese a no estar directamente relacionada con la naturaleza de nuestra área del conocimiento, nos permite trabajar en sinergia, en este sentido, en la presente tesis Doctoral se ha planteado como objetivo general estudiar la aplicación de la Lengua electrónica voltamétrica en la caracterización de alimentos en estado líquido.

Su desarrollo se realizó por medio de cuatro apartados; Uno inicial en el que se evaluó la posible influencia de la amplitud del potencial en una secuencia de pulsos aplicada a la evaluación de la capacidad antioxidante total en extractos de aliso. Un segundo en el que se evaluó la capacidad de la lengua electrónica para su utilización en análisis sensorial, más concretamente como equipo capaz de ser usado en un cribado inicial de muestras, previamente a la evaluación por un panel de catas. Para ello se realizaron estudios sobre

muestras de los 4 sabores básicos, así como sobre muestras de café y fruta. Un tercero en el que se evaluó la capacidad de la lengua electrónica voltamétrica como herramienta para una primera caracterización de cafés procedentes de Colombia y un cuarto capítulo en el que se evaluó 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.

Los ensayos se realizaron a través de un equipo diseñado y desarrollado por el IDM de la Universidad Politécnica de Valencia y que consta de un software, un potencióstato y la configuración a 3 electrodos (un electrodo de referencia un contra electrodo y un electrodo de trabajo que podría ser de Ir, Rh, Pt, Au. Ah. Co, Cu o Ni), las configuraciones de pulsos empleadas fueron diferentes en algunos casos dependiendo de lo que se quería obtener

Los resultados obtenidos han sido satisfactorios permitiéndonos aplicar el equipo de lengua electrónica voltamétrica en la caracterización de alimentos líquidos. Así se evaluó la capacidad antioxidante de muestras de aliso, se caracterizó, en base a sus principales atributos sensoriales, muestras de fruta como el camu camu y el kiwi y muestras de café. Además también se aplicó en la caracterización de muestras de café procedente de Colombia y se detectó el desarrollo de bacterias esporuladas en zumos pasteurizados.

ABSTRACT

Nowadays Food Industry has become in one of the most important around the world, but not only due to the contribution to the development of the economy and the international markets or the work place generation, but also because is the industry which manages a first necessity product for the human being.

The development of new technologies, publishing of new findings, implementation of new methods at the food industry, demands faster processes, more accurate methods and techniques, versatile and if possible with no need to be operated by qualified personnel, which can be employed in more important tasks.

Is for this reason that even fields of science which are not related to the nature of our area of knowledge are employed, allowing to us a synergic work, in this sense, at the present Doctoral Thesis, It has been proposed as a general objective to study the application of voltammetric electronic language in the characterization of foods in a liquid state.

It was developed in four chapters; a beginning where the influence of the potential amplitude on a pulse sequence was evaluated, applied to the measurement of the total antioxidant capacity of aliso extracts. A second where the capacity of the voltammetric electronic tongue to distinguish between four basic flavours was evaluated, besides coffee and fruit samples.

A third study where the capacity of the electronic tongue was tested as a tool to pre characterize different coffee samples coming from Colombia, and compared with physic chemical and organoleptic analysis, and a last study

where the electronic tongues were employed to analyze alteration on orange juices at early states, produced by sporulated bacteria.

All the essays were done through an equipment designed and developed by the IDM of the Polytechnic University of Valencia and which includes a software, a potentiostat, and a 3 electrode configuration (a reference electrode, a counter electrode and a working electrode that could be of Ir, Rh, Pt, Au, Ag, Co, Cu or Ni depending of the configuration of the equipment), The pulse setting configuration employed was different in some cases according to the data which was looked for.

The results obtained have been satisfactory allowing us to apply the voltammetric electronic tongue equipment in the characterization of liquid foods. Thus, the antioxidant capacity of aliso samples was evaluated. Fruit samples such as camu camu and kiwi and coffee samples were characterized based on their main sensory attributes. It was also applied in the characterization of samples of coffee from Colombia and the equipment was able to detect the development of bacteria sporulated in pasteurized juices.

RESUM

En l'actualitat la indústria alimentària s'ha convertit en una de les més importants del món, però no sols degut a la generació d'ocupacions ni a la contribució del desenvolupament de l'economia i els mercats internacionals, sinó perquè és la indústria gestora d'un producte de primera necessitat per al ser humà.

El desenvolupament de noves tecnologies, la publicació de noves troballes, implementació de nous mètodes en la indústria alimentària exigixen processos més ràpids, mètodes i tècniques d'anàlisi més precises, versàtils i que en la mesura que es pugui no demanin de mà d'obra especialitzada que pot ser empleada en tasques més importants.

És per això que s'impliquen camps de la ciència que a pesar de no estar directament relacionada amb la naturalesa de la nostra àrea del coneixement, ens permet treballar en sinergia, en este sentit, en la present tesi Doctoral s'ha plantejat com a objectiu general estudiar l'aplicació de la Llengua electrònica voltamètrica en la caracterització d'aliments en estat líquid.

El seu desenvolupament es va realitzar per mitjà de quatre estudis. Un inicial en què es va avaluar la possible influència de l'amplitud del potencial en una seqüència de polsos aplicada a l'avaluació de la capacitat antioxidant total en extractes de vern. Un segon en què es va avaluar la capacitat de la llengua electrònica per a la seua utilització en anàlisi sensorial, més concretament com a equip capaç de ser usat en un garbellament inicial de mostres, prèviament a l'avaluació per un panell de tastos. Per a això es van realitzar estudis sobre mostres dels 4 sabors bàsics, així com sobre mostres de cafè i fruita. Un tercer en què es va avaluar la capacitat de la llengua electrònica voltamètrica com a ferramenta per a una primera caracterització de cafés procedents de Colòmbia i un quart capítol en què es va avaluar la capacitat de la llengua electrònica voltamètrica de polsos, per al control durant els primers estadis, de la qualitat de suc de taronja pasteuritzat en els que pot existir un risc de desenvolupament de bacteris esporuladas.

Els assajos es van realitzar a través d'un equip dissenyat i desenrotllat per l'IDM de la Universitat Politècnica de València i que consta d'un programari, un potenciostat i la configuració a 3 elèctrodes (un elèctrode de referència un contra elèctrode i un elèctrode de treball que podria ser d'Anar, Rh, Pt, Au. Ah. Co, Cu o Ni).

Els resultats obtinguts han sigut satisfactoris podent-se aplicar en la caracterització d'aliments líquids. Així es va avaluar la capacitat antioxidant de mostres de vern, es va caracteritzar, basant-se en els seus principals atributs sensorials, mostres de fruita com el camu camu i el kiwi i mostres de café. A més també es va aplicar en la caracterització de mostres de café procedent de Colòmbia i es va detectar el desenrotllament de bacteris esporuladas en sucus pasteuritzats.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años, el desarrollo científico y tecnológico ha permitido el diseño de nuevos métodos y técnicas de análisis no invasivas, no destructivas, fiables, versátiles y que no requieran personal cualificado.

Entre estos nuevos métodos de análisis destacan los sensores electroquímicos (potenciométricos, voltamétricos e impedimétricos). Estas herramientas en muchos casos buscan la simulación de los sentidos del ser humano por medio de equipos o aparatos de visión artificial, dispositivos auditivos, instrumentos para la detección de olores o sabores. Este último tipo de sensores, también conocidos como Lenguas Electrónicas, son capaces de reconocer diferencias entre sabores mediante un mecanismo totalmente diferente a cómo trabaja el sentido del gusto. En el ser humano el sentido del gusto es el producto del reconocimiento de los compuestos presentes en el alimento por parte de quimiorreceptores de distinta naturaleza, los cuales envían una señal que posteriormente es procesada por el cerebro, en cambio, las lenguas electrónicas procesan las señales recibidas a través de electrodos por medio de herramientas de análisis de datos (quimiometría) con la finalidad de identificar o cuantificar compuestos o determinadas propiedades presentes en una muestra.

Una lengua electrónica puede definirse como un sistema basado en la interacción de múltiples sensores de baja sensibilidad, que junto a herramientas de reconocimiento de patrones o de análisis multivariante, permite la clasificación de muestras o en algunos casos la cuantificación de parámetros fisicoquímicos (Gutés, Céspedes, & del Valle, 2007). Estos dispositivos no se aplican únicamente como sensores del gusto o sabor, sino que además pueden ser utilizados en otros campos que incluyen el área

industrial, ambiental, clínica y alimentaria entre otras (Vlasov, Legin, & Rudnitskaya, 2002).

Tipos de lenguas electrónicas

Existen diferentes tipos de lenguas electrónicas dependiendo de su fundamento; como las lenguas potenciométricas basadas en matrices de sensores tipo ISE (Ion Selective Electrode/ electrodo selectivo de iones) o ISFETs (*ion-sensitive field-effect transistor*/ transistor de efecto campo sensible a iones); y las lenguas voltamétricas o amperométricas, en las cuales un grupo de sensores (no específicos) genera información multidimensional, producto de su interacción con las muestras, la información obtenida debido a su compleja naturaleza requiere ser analizada por medio de herramientas que permitan sacar provecho de la multidimensionalidad de la información obtenida de las muestras, por medio de selectividad cruzada (del Valle, 2010).

Lenguas electrónicas potenciométricas

Las lenguas electrónicas potenciométricas se basan en la medida del potencial que se establece entre dos electrodos cuando son sumergidos en una disolución. En este tipo de dispositivos no hay circulación de corriente eléctrica, sino que consiste en la diferencia de potencial entre ambos electrodos. En condiciones de corriente nula, el potencial de cada electrodo viene dado por la ecuación de Nernst, la cual establece que el potencial externo medido depende de diferentes factores como el material del que está compuesto el electrodo, la naturaleza y actividad de las especies presentes en la disolución o de la temperatura. De este modo, es posible

relacionar el potencial medido con la actividad o concentración de soluto en una disolución simple, no existiendo una dependencia directa de contacto entre el electrodo y la disolución (Wilson, Abbas, Radwan, & del Valle, 2011).

Lenguas electrónicas impedimétricas

El fundamento de las lenguas electrónicas impedimétricas se basa en los cambios de impedancia en la señal de partida. El análisis de las frecuencias de conductividad o capacitancia, ya sea mediante el uso completo de las distintas frecuencias o de un número de valores discretos seleccionados, junto con el uso de herramientas estadísticas como el análisis de componentes principales, permite la identificación de las muestras, incluso a niveles de concentraciones traza. (Grieshaber, MacKenzie, Vörös, & Reimhult, 2008).

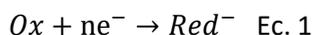
Lenguas electrónicas voltamétrica

En este tipo de lenguas se aplica un potencial determinado al electrodo de trabajo y se mide la corriente resultante obtenida cuando las especies redox activas se oxidan o reducen en la superficie del electrodo. Las lenguas voltamétricas presentan una mayor sensibilidad, versatilidad, simplicidad y robustez que las lenguas potenciométricas, ya que se encuentran menos influenciadas por las perturbaciones eléctricas. Además, con este tipo de lenguas se pueden emplear diferentes técnicas analíticas como son la voltametría cíclica o la de pulsos.

La primera lengua electrónica voltamétrica fue descrita por Winquist y colaboradores en 1997, la cual estaba formada por electrodos de trabajo de Pt y Au, un electrodo auxiliar y uno electrodo de referencia. Este sistema

incluía configuraciones de pulsos de gran amplitud (LAPV) y de corta amplitud (SAPV) combinado con herramientas de análisis multivariante, obteniendo buenos resultados de separación entre muestras.

La corriente resultante de la oxidación o reducción de un analito objetivo se considera una medida de su concentración, por lo que cuando una especie redox activa se reduce en la superficie del electrodo, la reacción sería la siguiente:



Donde *Ox* es la forma oxidada del analito y *Red* es su forma reducida. En condiciones normales de presión y temperatura, esta reacción redox tiene un potencial normal E^0 , el potencial del electrodo en el equilibrio, E_{elec} se puede utilizar para establecer una correlación entre la concentración de la especie oxidada (C_O) y de la forma reducida (C_R) del analito, de acuerdo con la ecuación de Nernst:

$$E_{elec} = E^{0'} + \frac{R.T}{n.F} \ln \frac{C_O}{C_R} \quad \text{Ec.2}$$

Cuando un electrodo metálico se sumerge en una solución electrolítica se producen una serie de procesos entre los que destaca la formación de la doble capa eléctrica o de *Helmholtz*, formada a su vez por la Capa rígida de *Helmholtz* y la denominada Capa difusa propuesta por *Gouy Chapman* (Campos Sánchez, 2013). La señal de la corriente obtenida por un pulso tiende a comportarse de forma exponencial, siendo determinada por la contribución de la corriente no farádica (producto de la reorganización de las cargas en la doble capa eléctrica) y de la corriente farádica (correspondiente

a las reacciones de oxidación – reducción que ocurren en la interfaz electrodo – disolución). En el caso de que la amplitud de potencial (pulso aplicado) no fuese suficiente para provocar reacciones redox, la corriente vendría dada únicamente por la componente no farádica; mientras que cuando existen reacciones redox, la corriente obtenida es la suma de las dos componentes. Ambas componentes están relacionadas con la naturaleza del electrodo y la concentración de las especies en la disolución, por lo que el estudio de la evolución de la respuesta electroquímica a través del tiempo nos permite obtener información sobre la composición química de la muestra objeto de estudio (Bard et al., 1993; Ivaništšev, Kirchner, Kirchner, & Fedorov, 2015).

Tipos de Voltametría.

La respuesta electroquímica depende directamente de la técnica electroquímica utilizada. En este sentido, existen diferentes técnicas:

- Voltametría de barrido Lineal (*Linear sweep voltammetry, LSV*). El potencial del electrodo de trabajo aumenta de modo lineal y a una velocidad aproximada entre 10 mV/s y 10 V/s. Se mide la corriente resultante y se representa su evolución en función del potencial. Cuando una de las especies presentes en la disolución alcanza su potencial de reacción se produce un aumento significativo en la corriente, al mismo tiempo que la concentración de la especie disminuye. Esto hace que la corriente decaiga, permitiendo así que se forme un pico de corriente en el voltograma que permite la identificación del potencial de reacción.
- Voltametría cíclica (*Cyclic Voltammetry, CV*). Esta técnica es similar a la voltametría de barrido lineal, con la diferencia de que cuando

alcanza el potencial máximo se lleva a cabo un barrido en sentido contrario hasta volver al potencial inicial.

- Voltametría de redisolución (*Stripping voltammetry, SV*). En este tipo de voltametría el analito se deposita en la superficie del electrodo por una oxidación o reducción al aplicar un potencial constante. Durante el proceso se realiza una agitación o se hace girar el electrodo, y tras una etapa de reposo y un barrido lineal se produce la reacción inversa.
- Voltametría de Pulsos. Este tipo de voltametría se clasifica en base a su configuración en: voltametría de pulsos de corta amplitud (*Short amplitude pulse voltammetry, SAPV*), voltametría de escalera cuando la tensión aplicada al electrodo se incrementa en pequeños escalones (*Staircase Voltammetry, SV*) o la generación de pequeños pulsos que en los que se incrementa el potencial de forma simétrica formando una especie de onda cuadrada (*Square Wave Voltammetry, SWV*) y voltametría de pulso diferencial o (*Differential Pulse Voltammetry, DPV*) al tiempo que se mide la corriente resultante. Como ejemplo de este tipo de técnicas se pueden citar la voltametría de pulsos normal (*Normal Pulse Voltammetry, NPV*) y la cronoamperometría (Dias, Meirinho, Veloso, Rodrigues, & Peres, 2016).

Son varios centros de investigación los que apuestan a este tipo de técnicas no destructivas, en nuestro caso, El Instituto Interuniversitario de Reconocimiento Molecular y Desarrollo Tecnológico de la UPV-UV (IDM) diseñó y desarrolló un sistema de Lengua electrónica voltamétrica que consta de un software para la configuración de las secuencias de pulsos, la

generación de ficheros de datos y el ajuste del sistema de electrodos. Este equipo es capaz de trabajar únicamente con el electrodo de referencia (ER) y el electrodo de trabajo (ET) o bien trabajar con una configuración a 3 electrodos, incluyendo además un contra electrodo (CE). El ER está formado por un electrodo Ag/AgCl, que le confiere una gran estabilidad ante cambios de concentración, lo que permite mantener una corriente constante a lo largo del ensayo. El ET está formado por cuatro metales nobles: Ir, Rh, Pt y Au; y por cuatro metales no nobles: Ag, Cu, Co y Ni. Éstos se encuentran contenidos en dos cilindros de acero inoxidable grado 316L, que funcionan como CE. La configuración de la secuencia de pulsos usada por el equipo es genérica, y está constituida por 22 pulsos que van desde -1000 mV hasta +1000 mV con una duración de 20 ms/pulso. Los resultados de cada ensayo se presentan en forma de matrices de datos muy extensas que requieren el tratamiento estadístico de los resultados mediante herramientas de análisis multivariante (Alcañiz Fillol, 2011).

Tratamiento de datos y Análisis estadístico.

Entre las herramientas más importantes para el análisis estadístico de los datos obtenidos mediante este tipo de sensores destacan el Análisis de Componentes Principales (PCA), Regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS) y el Proceso de control estadístico multivariante (MSPC).

Análisis de componentes Principales.

El Análisis de Componentes Principales (PCA) se emplea principalmente cuando existen más de 3 variables independientes. Esta técnica descompone la matriz de datos primarios en 2D (ejes X, Y), estableciendo una nueva base de coordenadas formada por direcciones ortogonales con una variación máxima de datos. Como resultado de este proceso se obtienen grupos conformados aleatoriamente en base a la mayor varianza obtenida entre muestras. Esta herramienta puede ser muy útil para definir comportamientos atípicos en los valores obtenidos y eliminarlos antes del tratamiento de datos (Chamorro, 2015).

Regresión de mínimos cuadrados parciales.

La Regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS) se utiliza para encontrar las relaciones fundamentales entre dos matrices (X e Y). Esta herramienta se basa en un enfoque de variable latente para modelar la estructura de covarianza en estos dos espacios. Un modelo de PLS trata de encontrar el sentido multidimensional en el espacio de X que explica la dirección de la máxima varianza multidimensional en el espacio Y. El PLS es especialmente adecuado cuando la matriz de predictores tiene más variables que observaciones, y cuando hay multi colinealidad entre los valores de X. Por el contrario, de no usarse este modelo se producirá un error estándar de la regresión. A lo largo de esta tesis se utilizó esta herramienta con el objetivo de correlacionar las medidas voltamétricas obtenidas mediante la lengua electrónica y los parámetros fisicoquímicos analizados a través de métodos analíticos convencionales. A partir de los resultados obtenidos se construyeron modelos de predicción de los parámetros fisicoquímicos, así

como modelos de reconocimiento por medio de validación cruzada (mediante validación por *Venetian Blinds*). Además, con la finalidad de obtener modelos de predicción más precisos se utilizó en algunos casos el tratamiento de loadings por medio del estudio de la Importancia de la variable en la Proyección (VIP). Este tratamiento estima la importancia de cada variable en la proyección usada en un modelo PLS, las variables a tomarse en cuenta posterior al análisis VIP serán aquellas que sean iguales o mayor que 1 y todas las demás se excluyen del modelo. (Chong & Jun, 2005)

Por último, el Proceso de control estadístico multivariante (MSPC) se lo utilizo debido a la gran cantidad de variables involucradas en el estudio de estabilidad de zumos de naranja. Este tipo de ensayo es utilizado frecuentemente en industrias alimentarias con la finalidad de asegurar la calidad de sus productos, se suelen construir conjuntos de datos homogéneos, que posteriormente con la ayuda de gráficas de control de Shewhart permiten identificar variables fuera de control, contribuyendo de forma directa en la detección de efectos anormales en el proceso de producción.

Si bien es cierto existe una variedad de estudios con respecto a la aplicación de las lenguas electrónicas voltamétricas existe un sinfín de variables que afectan a los análisis, algunas de ellas se pueden controlar y otras es algo más complejo como por ejemplo las interacciones de los compuestos presentes en una solución, con respecto a los ensayos que se mencionan a continuación, por lo general suelen trabajar con diferentes tipos de electrodos o a su vez se basan en técnicas potenciométricas o impedimétricas como por ejemplo, Wei y colaboradores, quienes

compararon los resultados de clasificación y predicción del origen de diferentes muestras de miel que fueron analizadas tanto por una lengua electrónica potenciométrica como por una lengua electrónica voltamétrica (Wei & Wang, 2014), las dos técnicas mostraron afinidad en la predicción del origen floral y geográfico de las muestras, o a su vez Ivarsson y colaboradores en 2001 (Ivarsson, Holmin, Höjer, Krantz-Rülcker, & Winquist, 2001) emplearon una lengua electrónica voltamétrica desarrollada en la Universidad de Linköping, compuesta de tres electrodos de trabajo contruidos por diferentes metales, y que se usaron en combinación con una configuración de pulsos con la finalidad de diferenciar entre nueve muestras de té, de entre todas las configuraciones voltamétricas que se empleó, la que permitió observar un PCA con mejor agrupamiento fue la resultante de la configuración de voltametría de pulsos de larga amplitud, discriminación de muestras de aceites vegetales (Rodríguez-Méndez, Apetrei, & De Saja, 2010) analizados por medio de electrodos modificados, se llegó a la conclusión de que definitivamente el sabor no guarda relación directa con los valores obtenidos en este caso.

Ensayos de análisis sensorial como el de Cetó (Cetó, González-Calabuig, Capdevila, Puig-Pujol, & Del Valle, 2015), confirman que sí que puede haber una cierta correlación entre los valores obtenidos por un panel sensorial conformado por catadores expertos y una lengua voltamétrica usada como herramienta para estandarizar la cata de vinos, como una forma de alcanzar una Denominación de origen diferente relacionada con la región geográfica y para asegurar altos estándares de calidad, parámetros como volumen de alcohol, acidez volátil, pH o la cantidad de azúcar y otras fueron analizadas y así asegurarse de la concordancia con los datos requeridos por la

denominación de origen, el análisis se aplicó a un total de 71 vinos de diferentes productores, y para el ensayo se empleó un dispositivo con 6 electrodos, que consistían de dos electrodos metálicos como el Au y el Pt y otros electrodos a base de aleaciones como por ejemplo electrodos de grafito, así como otros tres electrodos usando partículas de Cu, Pt y Co, los datos obtenidos por medio del análisis Voltamétrico se confirmó por medio del análisis sensorial. Otro campo en el que las lenguas electrónicas voltamétricas han sido de gran utilidad es en el análisis de aguas, donde ya han sido consideradas como una poderosa herramienta de vigilancia (Winqvist, Olsson, & Eriksson, 2011), especialmente en el caso del agua potable, ya que permiten detectar anomalías e incluso identificar posibles contaminantes con los que el sistema ha sido previamente entrenado (Eriksson et al., 2011).

REFERENCIAS.

- Alcañiz Fillol, M. (2011). Diseño de un sistema de lengua electrónica basado en técnicas electroquímicas voltamétricas y su aplicación en el ámbito agroalimentario, 295. Retrieved from <http://tdx.cesca.cat/handle/10803/34322>
- Bard, A. J., Abruia, H. D., Chidsey, C. E., Faulkner, L. R., Feldberg, S. W., Melroy, O., White, H. S. (1993). The Electrode / Electrolyte Interface- A Status Report, 7147–7173.
- Campos Sánchez, I. (2013). Sensores electroquímicos tipo lengua electrónica voltamétrica aplicados al control medioambiental y a la industria alimentaria, 260.

- Cetó, X., González-Calabuig, A., Capdevila, J., Puig-Pujol, A., & Del Valle, M. (2015). Instrumental measurement of wine sensory descriptors using a voltammetric electronic tongue. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 207(PB), 1053–1059. <http://doi.org/10.1016/j.snb.2014.09.081>
- Chamorro, E. O. B. (2015). *Desarrollo de la técnica de lengua electrónica voltamétrica para la determinación de la capacidad antioxidante total de extractos de plantas y frutas peruanas*.
- Chong, I. G., & Jun, C. H. (2005). Performance of some variable selection methods when multicollinearity is present. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 78(1), 103–112. <http://doi.org/10.1016/j.chemolab.2004.12.011>
- del Valle, M. (2010). Electronic Tongues Employing Electrochemical Sensors. *Electroanalysis*, 22, 1539–1555. <http://doi.org/10.1002/elan.201000013>
- Dias, L. G., Meirinho, S. G., Veloso, A. C. A., Rodrigues, L. R., & Peres, A. M. (2016). *Electronic tongues and aptasensors. Bioinspired Materials for Medical Applications*. Elsevier Ltd. <http://doi.org/10.1016/B978-0-08-100741-9.00013-9>
- Eriksson, M., Lindgren, D., Bjorklund, R., Winqvist, F., Sundgren, H., & Lundström, I. (2011). Drinking water monitoring with voltammetric sensors. *Procedia Engineering*, 25, 1165–1168. <http://doi.org/10.1016/j.proeng.2011.12.287>
- Grieshaber, D., MacKenzie, R., Vörös, J., & Reimhult, E. (2008). Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures. *Sensors*, 8(3), 1400–1458. <http://doi.org/10.3390/s8031400>
- Gutés, A., Céspedes, F., & del Valle, M. (2007). Electronic tongues in flow analysis. *Analytica Chimica Acta*, 600(1–2 SPEC. ISS.), 90–96. <http://doi.org/10.1016/j.aca.2007.03.039>
- Ivaništšev, V., Kirchner, K., Kirchner, T., & Fedorov, M. V. (2015). Restructuring of the electrical double layer in ionic liquids upon charging. *Journal of Physics. Condensed Matter : An Institute of Physics Journal*, 27(10), 102101. <http://doi.org/10.1088/0953-8984/27/10/102101>

- Ivarsson, P., Holmin, S., Höjer, N. E., Krantz-Rülcker, C., & Winquist, F. (2001). Discrimination of tea by means of a voltammetric electronic tongue and different applied waveforms. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 76(1–3), 449–454. [http://doi.org/10.1016/S0925-4005\(01\)00583-4](http://doi.org/10.1016/S0925-4005(01)00583-4)
- Rodríguez-Méndez, M. L., Apetrei, C., & De Saja, J. A. (2010). *Electronic Tongues Purposely Designed for the Organoleptic Characterization of Olive Oils. Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention*. Elsevier Inc. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-374420-3.00057-7>
- Vlasov, Y., Legin, A., & Rudnitskaya, A. (2002). Electronic tongues and their analytical application. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 373(3), 136–146. <http://doi.org/10.1007/s00216-002-1310-2>
- Wei, Z., & Wang, J. (2014). Tracing floral and geographical origins of honeys by potentiometric and voltammetric electronic tongue. *Computers and Electronics in Agriculture*, 108, 112–122. <http://doi.org/10.1016/j.compag.2014.07.014>
- Wilson, D., Abbas, M. N., Radwan, A. L. A., & del Valle, M. (2011). Potentiometric electronic tongue to resolve mixtures of sulfide and perchlorate anions. *Sensors*, 11(3), 3214–3226. <http://doi.org/10.3390/s110303214>
- Winquist, F., Olsson, J., & Eriksson, M. (2011). Multicomponent analysis of drinking water by a voltammetric electronic tongue. *Analytica Chimica Acta*, 683(2), 192–197. <http://doi.org/10.1016/j.aca.2010.10.027>
- Winquist, F., Wide, P., & Lundström, I. (1997). An electronic tongue based on voltammetry. *Analytica Chimica Acta*, 357(1–2), 21–31. [http://doi.org/10.1016/S0003-2670\(97\)00498-4](http://doi.org/10.1016/S0003-2670(97)00498-4)

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

El objetivo general planteado en la presente tesis doctoral es estudiar la aplicación de la Lengua electrónica voltamétrica en la caracterización de alimentos en estado líquido. Para su desarrollo se han definido cuatro objetivos específicos que conforman los cuatro capítulos que componen esta tesis.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Capítulo I. Evaluar la influencia de la amplitud del potencial en una secuencia (tren) de pulsos de Lengua Electrónica Voltamétrica (VET) aplicada a evaluar la capacidad antioxidante total en aliso.

Capítulo II. Evaluar la capacidad de la lengua electrónica para su utilización en análisis sensorial, más concretamente como equipo capaz de ser usado en un cribado inicial de muestras, previamente a la evaluación por un panel de catas.

Capítulo III. Evaluar la capacidad de la lengua electrónica voltamétrica como herramienta para una primera caracterización de cafés.

Capítulo IV. 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.

CAPÍTULO I

INFLUENCIA DE LA AMPLITUD DEL POTENCIAL EN UNA SECUENCIA (TREN) DE PULSOS DE LENGUA ELECTRÓNICA VOLTAMÉTRICA (VET) APLICADA A EVALUAR LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE ALISO.

Food Chemistry 224 (2017) 233–241

Esteban Fuentes, Miguel Alcañiz, Laura Contat, Edwin O. Baldeón, José M. Barat, Raúl Grau.

Versión adaptada para la tesis doctoral

RESUMEN

Cuatro secuencias de pulsos han sido estudiadas, dos de ellas conformadas por pequeños incrementos de potencial y dos con mayores incrementos. Las señales de corriente más altas se obtuvieron cuando se utilizó un mayor incremento o cambio de potencial, aunque el mejor resultado se obtuvo cuando se incluyó un pulso intermedio previo al pulso más influyente que conforma la secuencia del tren de pulsos. Un modelo matemático basado en el patrón antioxidante Trolox se desarrolló para predecir la capacidad antioxidante del aliso, empleando información obtenida de todos los electrodos, incluso cuando el modelo de validación se podía haber realizado solamente empleando la información proveniente del electrodo de oro.

INTRODUCCIÓN.

La popularidad de los compuestos antioxidantes se encuentra relacionada con su capacidad para disminuir o incluso neutralizar la interacción de radicales libres o especies reactivas con el oxígeno, que pudiesen ocasionar diferentes tipos de patologías y enfermedades (Halliwell, 1994). Regiones andinas como el Perú, poseen un gran número de especies endémicas y variedades de plantas con propiedades únicas y funcionales (Bussmann & Sharon, 2009).

Entre otras plantas, el Aliso (*Alnusacuminata*) posee una importante característica antioxidante, dada principalmente por su contenido en compuestos polifenólicos como las catequinas (Chirinos, Pedreschi, Rogez,

Larondelle, & Campos, 2013). Su consumo es principalmente en infusión, como si fuese una bolsa de té, por lo que un método rápido y de bajo costo que evaluase la capacidad antioxidante de estas infusiones podría ser de gran interés.

Varios estudios sugieren el uso de técnicas voltamétricas para la determinación de la capacidad antioxidante. Estos métodos electroquímicos son ampliamente utilizados en química analítica gracias a su sensibilidad, versatilidad, simplicidad y robustez. La voltametría se basa en la medición del flujo de corriente que pasa a través de un electrodo de trabajo cuando se le aplica una variación de potencial. Los principales contribuyentes para la generación de esta corriente son los intercambios de carga iónica debido a las reacciones químicas que ocurren en la interfaz electrodo de trabajo (procesos farádicos) y la reorganización de las cargas en la doble capa electroquímica ocasionada por los cambios de potencial en el electrodo (procesos no farádicos). El tipo de secuencia de pulsos aplicados al electrodo de trabajo, varía de acuerdo a técnica voltamétrica a emplearse (Bard & Faulkner, 2002).

En voltametría de barrido lineal y voltametría cíclica, un potencial lineal de barrido es aplicado al electrodo de trabajo mientras se mide la corriente. La curva resultante i - E (voltaograma) proporciona información sobre los procesos farádicos que ocurren en la interfaz del electrodo. Estos dos métodos electroquímicos son una herramienta muy útil para caracterizar materiales de electrodos y para determinar las propiedades redox de moléculas presentes en una solución. La voltametría cíclica ha sido empleada para un amplio rango de aplicaciones sensoriales, análisis de uvas (Medina-

Plaza, de Saja, & Rodriguez-Mendez, 2014), clasificación de té (Bhattacharyya et al., 2012), monitorización de la formación de biofilms (Kang, Kim, Tak, Lee, & Yoon, 2012), detección de insulina (Habibi, Omidinia, Heidari, & Fazli, 2016), determinación de etanol y metanol (Pereira, Sousa, Munoz, & Richter, 2013), evaluación de neurotransmisores (Singh, Sawarynski, Dabiri, Choi, & Andrews, 2011), entre otros.

La cuantificación de la capacidad antioxidante total en bebidas alcohólicas (G. Toro, López, & Taipe, 2011), especias (Ziyatdinova & Budnikov, 2014), fluidos corporales (Shlomit Chevion, Berry, Kitrossky, & Kohen, 1997; Psotová, Zahálková, Hrbác, Šimánek, & Bartek, 2001), tejidos animales (S Chevion, Or, & Berry, 1999) y frutas (Hoyle & Santos, 2010), también se ha logrado por medio de voltametría cíclica.

En voltametría de pulsos, la señal aplicada al electrodo es una secuencia de diferentes potenciales. Las técnicas voltamétricas de pulsos más relevantes son la Voltametría de onda cuadrada (SWV), Voltametría diferencial de pulsos (DPV) y la Voltametría de pulso normal (NPV). En todos estos métodos, la corriente generalmente es muestreada al inicio o al final de cada pulso obteniendo la curva $i - E$. La información obtenida es muy similar a la obtenida por voltametría cíclica, pero estas técnicas permiten incrementar la sensibilidad y reducir los tiempos de medición. La voltametría de pulsos es una técnica extremadamente útil para medir compuestos tanto orgánicos como inorgánicos presentes en una muestra, incluso a concentraciones de 10^{-8} M (J. Wang, 2006). La voltametría de pulsos es un método muy viable para determinar compuestos fenólicos y poli fenólicos, permitiendo la evaluación de la capacidad antioxidante total de las muestras analizadas,

teniendo como gran ventaja que no requiere de grandes cantidades de reactivos, materiales o equipos. Su alta selectividad puede permitir la identificación incluso de nuevos compuestos (Blasco, González, & Escarpa, 2004).

Un enfoque diferente se emplea para la cronoamperometría, donde dos potenciales de pulso son aplicados, y se recoge la corriente producto de la evolución a lo largo del tiempo. La ventaja de esta técnica es que la información obtenida se relaciona con los procesos farádicos y no farádicos. Una versión modificada de la cronoamperometría es el uso de las lenguas voltamétricas electrónicas (VET), donde una secuencia de pulsos con amplitudes arbitrarias es aplicada a diferentes electrodos de trabajo y los valores de la evolución temporal de la corriente son procesados por herramientas de análisis multivariante para clasificar las muestras o para cuantificar compuestos en una matriz compleja. Las aplicaciones de las VET incluyen análisis de calidad para agua potable y aguas residuales (Campos, Alcañiz, Aguado, et al., 2012; Eriksson et al., 2011) , evaluación de la capacidad antioxidante de camu camu y tumbo (Baldeón et al., 2015) y la cuantificación de ácidos orgánicos, málico, cítrico y ascórbico (Escobar et al., 2013).

Un factor muy importante a ser considerado en mediciones con Lenguas electrónicas voltamétricas es el diseño de la secuencia o tren de pulsos (Ivarsson, Holmin, Höjer, Krantz-Rülcker, & Winquist, 2001). Algunos autores han estudiado la optimización de los modelos de clasificación y predicción obtenidos por medio de las LEV a través de un tren de pulsos personalizado o específico. En algunos casos, el diseño de la secuencia de pulsos se basa en

un estudio previo de los procesos electroquímicos que ocurren a lo largo de la medición (Campos, Alcañiz, Masot, et al., 2012). En otros casos, la capacidad de discriminación de los modelos de clasificación es mejorada por medio de la modificación en el ancho de los pulsos (Tian, Deng, & Chen, 2007). La importancia de cada pulso en la secuencia de pulsos también ha sido estudiada. Por ejemplo, la importancia de las puntuaciones de las variables en la proyección (VIP), han sido utilizadas para identificar pulsos y han proporcionado información más relevante en el análisis de extractos de camu camu a través de LEV (Baldeón et al., 2015). Una posible aplicación a este enfoque sería la disminución del número de pulsos, incluyendo solamente los pulsos influyentes seleccionados en la secuencia del tren de pulsos. De todas formas, se necesita de investigación adicional para determinar si la eliminación de algunos pulsos de la secuencia podría afectar la información obtenida en los pulsos relevantes.

En base a lo expuesto se planteó como objetivo de este estudio evaluar la influencia de la amplitud del potencial en una secuencia (tren) de pulsos de Lengua Electrónica Voltamétrica (VET) aplicada a evaluar la capacidad antioxidante en aliso.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de muestras

Las muestras de Aliso (*Alnusacuminata*) se obtuvieron en un mercado local en Huancayo (Junín, Perú). Las hojas se lavaron y secaron a través de aire caliente a 60°C por 3 horas hasta peso constante. Luego del proceso de secado, las hojas fueron trituradas hasta alcanzar un tamaño similar al de las hojas en las bolsas de té comerciales. El proceso de extracción se basó en el procedimiento doméstico para hacer té empleando bolsas de té comerciales (Almajano, Carbó, Jiménez, & Gordon, 2008; Chan, Lim, Chong, Tan, & Wong, 2010; Samaniego-Sánchez et al., 2011). Tres gramos de hojas se mezclaron con 300mL de agua a 85°C por 5 minutos con agitación constante, filtrándose posteriormente.

Para obtener la respuesta voltamétrica del aliso, la infusión se preparó a diferentes concentraciones 2.5%, 5%, 10% y 20% (v/v) con una solución electrolítica (0.01M buffer fosfato), hecha de la mezcla de fosfato de potasio (KH_2PO_4) y di hidrógeno fosfato tri hidratado de potasio ($\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) ajustado a pH 7.4. Esta solución electrolítica es necesaria para mantener un mínimo de flujo de corriente cuando la muestra está más diluida.

Para comparar los comportamientos de las respuestas voltamétricas de las infusiones de aliso con un patrón químico antioxidante, también se midieron diluciones de trolox (0.25, 0.5, 1.25, 2.5 y 5mM) en solución fosfato. La respuesta voltamétrica del trolox también se empleó para desarrollar un modelo matemático para ser empleado en la predicción de la capacidad antioxidante total de aliso, expresada en equivalentes trolox.

Con la finalidad de comprobar la precisión de la predicción de los valores de capacidad antioxidante y compararlos con los valores reales, se empleó el método químico de referencia ABTS, con ligeras modificaciones, basado en la metodología de Re (Re et al., 1999), descrita por (Kuskoski, Asuero, Troncoso, Mancini-Filho, & Fett, 2005)). Como resultado, la capacidad antioxidante del aliso, expresada en equivalentes trolox, fue de 10.58 ± 0.73 mM, los cuales fueron similares a los valores obtenidos por otros autores (Chirinos et al., 2013). En base a este resultado los valores para las diluciones de aliso (2.5, 5, 10, 50% v/v) fueron 0.26 mM, 0.53 mM, 1.058 mM y 2.12 mM respectivamente.

El ensayo con diferentes concentraciones del analito, nos permitió no solo conocer la capacidad del equipo para ordenar y caracterizar las muestras de acuerdo a su respuesta voltamétrica, sino también la posibilidad de definir comportamientos de los patrones de ciertos compuestos químicos en la solución a ser analizada.

Lengua electrónica Voltamétrica.

El sistema de medición utilizado en esta ocasión fue diseñado y desarrollado por el Instituto de Reconocimiento Molecular y Desarrollo tecnológico de la Universidad Politécnica de Valencia en España (Garcia-Breijo et al., 2013). Consiste de un equipo electrónico conectado a un ordenador, una aplicación software que se ejecuta en un ordenador para poder interactuar con los electrodos. La aplicación informática permite la configuración de las mediciones (incluyendo la definición de la señal a ser aplicada sobre los electrodos de trabajo). Una vez configurado el patrón de pulsos, la información correspondiente es enviada al equipo electrónico, que recoge las mediciones y transmite la evolución temporal de los valores de la señal

de corriente resultante hacia el computador. La información recogida se almacena en el ordenador para el posterior procesamiento a través de herramientas de análisis multivariante.

Cuatro electrodos de trabajo, a partir de metales nobles (Ir, Rh, Pt y Au) con un 99.9% de pureza y 1mm de diámetro, fueron utilizados en el estudio. Los electrodos nobles se alojaron en cilindros de acero inoxidable usados al mismo tiempo como cuerpo del sistema de lengua electrónica voltamétrica así como también como contra electrodo (área de superficie de 11.86 cm², cuando el electrodo se encuentra sumergido 2 cm en la muestra) (Figura I.1). Un electrodo estándar Ag/AgCl se usó como electrodo de referencia.

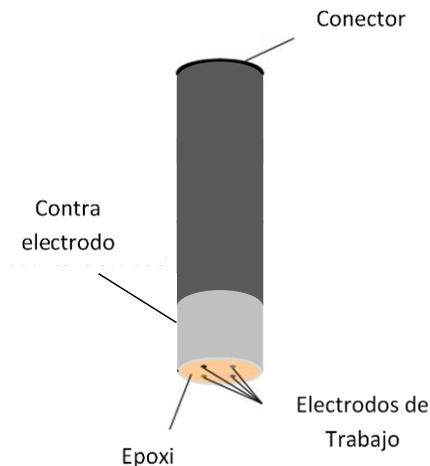


Figura I. 1. Matriz de electrodos metálicos: cables de Ir, Rh, Pt and Au moldeados en resina dental fueron utilizados como electrodos de trabajo. El cuerpo de acero inoxidable fue usado como contra electrodo.

Secuencia de pulsos. Estudiando de la influencia de la amplitud de potencial de un pulso en el orden de la secuencia.

Con el fin de evaluar como el potencial de la señal aplicada a un electrodo de trabajo de la Lengua electrónica voltamétrica afecta a la respuesta voltamétrica, cuatro señales diferentes fueron estudiadas. La primera señal evaluada fue un barrido de potencial lineal, usada frecuentemente en voltametría cíclica (Figura I.2a) con un potencial máximo y mínimo de 1000 mV y -1000 mV respectivamente, y una velocidad de barrido de 250 mV/s. Debido al proceso de digitalización que ocurre en el equipo de medición, esta señal comprendió micro pulsos con una amplitud de 8 mV y una duración o ancho de pulso de 32 ms. La segunda señal (Figura I.2b) estuvo conformada por 50 micro pulsos (50+) con un incremento de potencial entre pulsos de 18 mV, empezando a 0 mV y alcanzando un potencial máximo de 800 mV. La tercera secuencia (4+) incluyó cuatro pulsos de 0 mV, 200 mV, 500 mV y 800 mV (Figura I.2c) mientras la cuarta secuencia (3+) consistía en tres pulsos a 0, 500 mV, y 800 mV, siendo el ancho o duración del pulso para las últimas de secuencias de 100 ms.

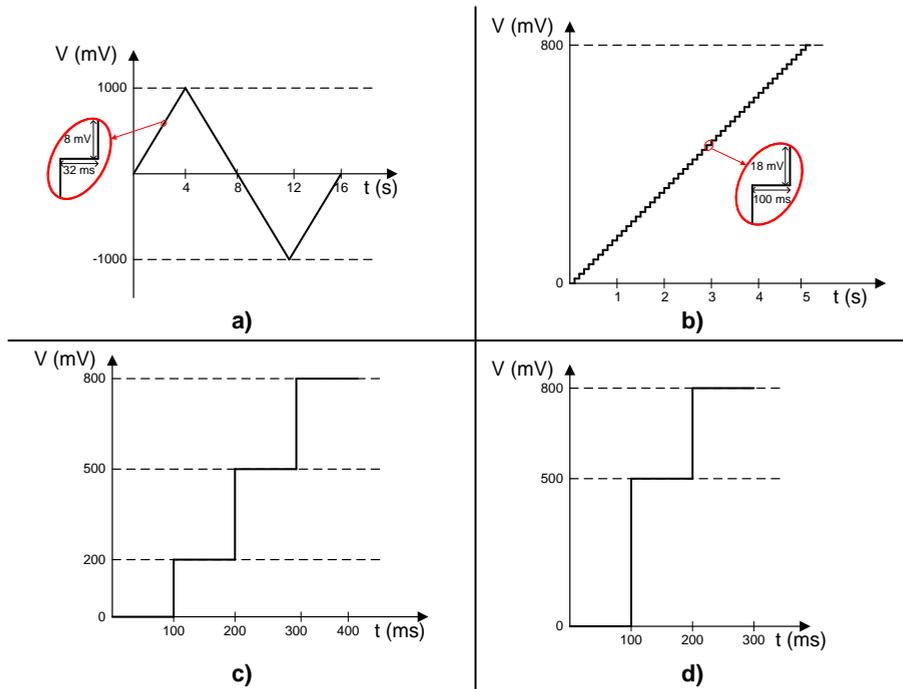


Figura 1. 2. Señales aplicadas a los electrodos de trabajo de la LEV. a) Potencial lineal de barrido con un voltaje máximo de 1,000 mV, un voltaje mínimo de -1,000 mV una velocidad de barrido de 250 mV/s; b) 50 micro pulsos con un incremento de potencial de 18 mV entre pulsos, desde 0 mV hasta 800 mV; c) cuatro pulsos de 0 mV, 200 mV, 500 mV y 800 mV; d) tres pulsos de 0 mV, 500 mV y 800 mV. Para las señales b), c) y d), el ancho o duración del pulso fue de 100 ms.

Análisis Estadístico

El efecto de la concentración de las muestras sobre la respuesta voltamétrica con diferentes amplitudes de pulso (tiempo de aplicación de un pulso) fue sujeto a un estudio de varianza (ANOVA).

Para obtener el modelo de predicción para la determinación de la capacidad antioxidante, se utilizó la regresión local ponderada (LWR). LWR calcula un modelo de regresión local ponderada usando el número dado de la regresión de componentes principales (PCR) n_{comp} para predecir una variable dependiente y de un grupo de variables independientes x . Los modelos LWR son muy útiles para realizar predicciones cuando las variables dependientes y tienen una relación no lineal con las variables independientes medidas x (Centner & Massart, 1998; Cleveland & Devlin, 1988). Para realizar el análisis, dos tercios del total de los datos disponibles fueron utilizados para desarrollar los modelos, y los datos restantes se utilizaron para testarlos (predicción).

La bondad de la precisión de los modelos, y la predicción de antioxidante, se realizó mediante el error cuadrático medio relativo (RMSEP), bias y R^2 para la regresión de la predicción.

La metodología utilizada para el entrenamiento de los modelos fue Venetian Blinds, donde cada conjunto de prueba (conjunto =5) se determina seleccionando cada X objetos en el conjunto de datos, empezando con los objetos enumerados 1 hasta llegar a X ($X=5$).

Los análisis estadísticos se realizaron por medio de la herramienta PLS Toolbox 6.3 (Eigenvector Research Inc., Wenatchee, Washington, USA), una extensión en el ambiente computacional R2012a (The Mathworks, Natick, Massachusetts, USA).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Evaluación de las configuraciones de potenciales.

Los voltogramas obtenidos cuando se aplicó la señal configurada para voltametría cíclica mostraron una respuesta voltamétrica diferente tanto para la respuesta del patrón químico trolox como para las diluciones de aliso. Para el trolox, los voltogramas de todos los electrodos nobles (Ir, Rh, Pt and Au) mostraron un pico electroquímico característico, cuyo valor se incrementó de acuerdo a la concentración de la dilución. Las Figuras I.3 y I.4 muestran los voltogramas cíclicos para el Ir Rh y el Pt y el Au sobre trolox (A) y aliso (B) respectivamente. Los voltogramas de trolox mostraron reacciones redox casi reversibles con un marcado punto máximo anódico alrededor de 750 mV para el Ir, 650 mV para el Rh, 550 mV para el Pt y alrededor de 480 mV para Au. Otros autores han observado un comportamiento electroquímico similar para el trolox (Gulaboski, Mirčeski, & Mitrev, 2013; Pekec, Feketefoldi, Ribitsch, Ortner, & Kalcher, 2013; Pohanka et al., 2011), en los que se obtuvieron reacciones redox irreversibles alrededor de +0.4 V por medio de electrodos de trabajo de carbón cristalizado o a 670 mV, cuando los electrodos fueron de Pt. En nuestro caso, y de acuerdo a los potenciales máximos observados (480 mV y 750 mV), el intervalo de potenciales establecido fue desde 0 mV hasta 800 mV.

En las muestras de aliso, este comportamiento electroquímico solo fue replicado por el electrodo de oro, obteniéndose una respuesta atenuada a los 400 mV. Ningún otro electrodo mostró reacciones electroquímicas características para las muestras de aliso a los potenciales en los que se

obtuvieron picos representativos para las muestras de trolox. En consecuencia, el uso de voltametría cíclica con los electrodos de Pt, Ir o Rh, no permitieron ninguna discriminación entre las diferentes concentraciones de aliso testadas. El hecho de que la respuesta voltamétrica observada para trolox se haya atenuado, o en algunos casos incluso desaparecido, cuando se analizan muestras de aliso, puede ser debió a la absorción de una variedad de compuestos sobre la superficie del electrodo, además de los compuestos fenólicos y poli fenólicos, aceites esenciales y otros componentes presentes en el aliso (Gonzalez, Suarez, Garcés de Granada, & Orozco de Amezcua, 2011).

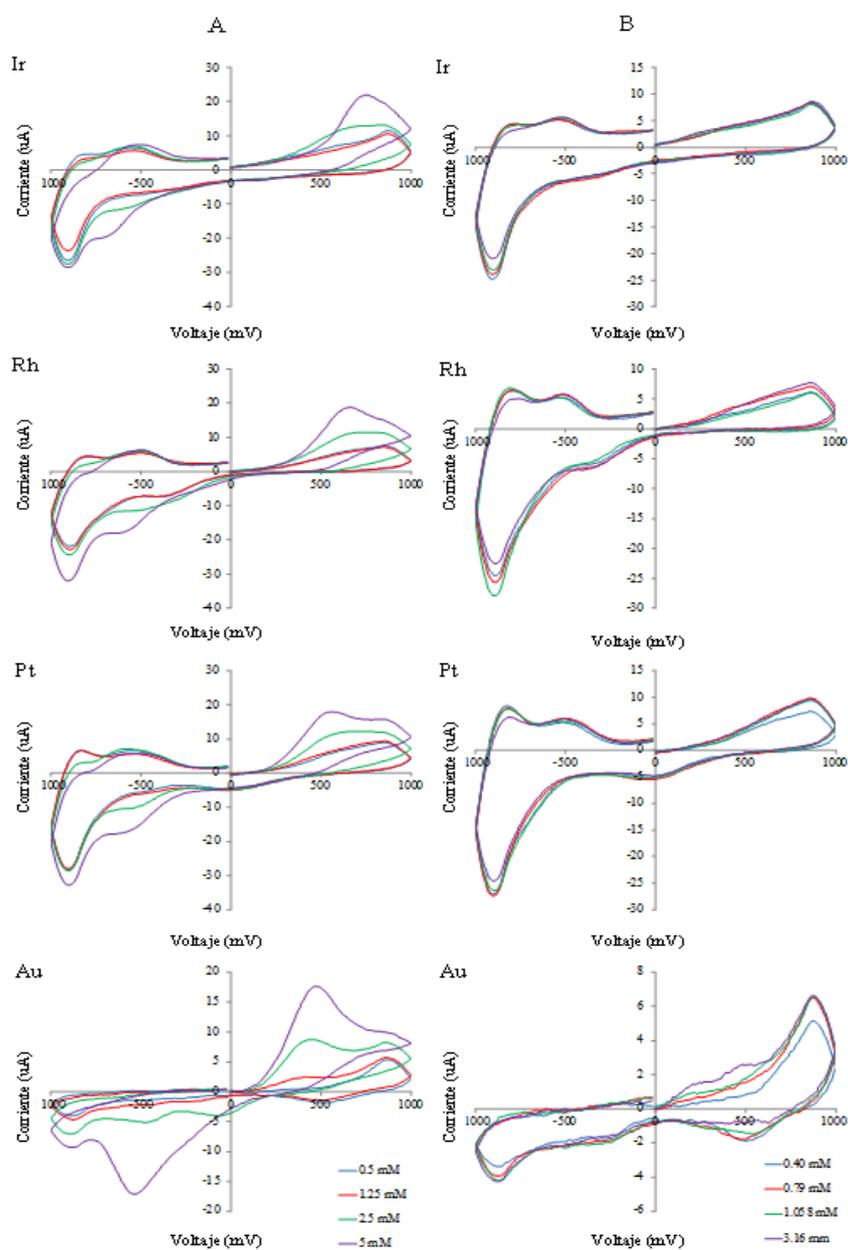


Figura I. 3. Respuestas obtenidas por voltametría cíclica de Trolox (A) y Aliso (B) a través de los electrodos de Ir, Rh, Pt and Au.

La figura I.4 muestra los valores de la evolución temporal de la corriente medida cuando se aplicó, sobre diluciones de aliso, un pulso de 800 mV a los electrodos de Ir y Rh y de 500 mV a los electrodos de Pt y Au, para las configuraciones de pulsos 50+ (A), 3+ (B), y 4+ (C). Con la finalidad de simplificar un poco el análisis de las respuestas electroquímicas, solamente cinco puntos a lo largo de la corriente recogida por el pulso (20, 40, 60, 80 y 100 ms) se extrajeron, mostrándose el promedio y error estándar de cada repetición. La selección de los pulsos, de cada electrodo, para ser analizados se basó en la respuesta voltamétrica observada durante la medición del trolox por voltametría cíclica (Figura I.3).

De acuerdo a los resultados, una configuración diferente de pulsos produce distintas respuestas electroquímicas, las cuales pueden ser capaces o no de reconocer y discriminar entre muestras y concentraciones (Ivarsson et al., 2001). Así, la configuración de pulsos 50+ no pudo discriminar entre las diferentes concentraciones de aliso, para ninguno de los electrodos (Figura I.4a). La señal de la voltametría cíclica y la generada por la secuencia de pulsos 50+ fueron sorprendentemente parecidas, así como el resultado de la respuesta a corrientes de 500 mV y 800 mV.

Para todos los electrodos, los valores de corriente medida por medio de las secuencias de pulsos 3+ y 4+ fueron mucho más altas que las obtenidas con voltametría cíclica y con la secuencia de pulsos 50+. De acuerdo a estos resultados, un incremento en la diferencia de potencial entre dos pulsos consecutivos, en la secuencia de pulsos, aumentaría la corriente medida. Parte de esta corriente fue de origen farádico, mientras que la otra parte de

la corriente fue debido a procesos no farádicos (doble capa electroquímica) (Winqvist, 2008).

La secuencia de pulsos 4+ mostró un buen nivel de discriminación entre las diluciones de aliso para los electrodos de Pt y Au y un nivel moderado de discriminación para los electrodos de Ir y Rh, mientras que para la secuencia de pulsos 3+ solamente el electrodo de Au presentó un nivel aceptable de discriminación entre muestras. La desviación estándar de los datos obtenidos por medio de la secuencia de pulsos 3+ fue mayor que la obtenida mediante la secuencia 4+. La causa de estas diferencias podría estar ocasionada por la importancia de los procesos no farádicos para cada secuencia de pulsos. La transición entre 0 V y 500 mV, en la secuencia de pulsos 3+, se hizo en un solo paso, mientras que un pulso intermedio de 200 mV se introdujo en la secuencia de pulsos 4+. La corriente no farádica estuvo relacionada con la reorganización de cargas en la superficie de los electrodos cuando el potencial aplicado fue modificado. Cuando el potencial cambio en un solo paso, el proceso de reorganización de las cargas se tornó más importante, produciendo una mayor corriente no farádica. Cuando el cambio de potencial se alcanzó en dos pasos, la corriente no farádica generada cuando el potencial requerido fue alcanzado fue más baja. Para la secuencia de pulsos 3+ la componente no farádica de la corriente medida fue mayor que para la secuencia de pulsos 4+. Entonces a mayor incremento en la diferencia de potencial entre dos pulsos consecutivos, los valores de corriente generada son mayores, pero la presencia de un pulso intermedio antes del pulso relevante incrementa incluso más la diferencia de corriente. Por otra parte, esto implica una mayor dispersión en las medidas para la secuencia de pulsos 3+ ya que las corrientes no farádicas se vieron afectadas por algunos factores

como por ejemplo, la forma de la celda electroquímica, conductividad de la muestra y otras (Bataller, Gandía, García-Breijo, Alcañiz, & Soto, 2015), por consecuencia tuvieron baja reproducibilidad. Además, debido a que la secuencia de pulsos 4+, presentó menores componentes no farádicas, la principal contribución a la corriente medida vino de los procesos farádicos, que para los electrodos de Au y Pt a 500 mV, estuvieron relacionados con la capacidad antioxidante (Figura I.4). La mejor señal farádica, que es capaz de discriminar entre concentraciones, también se generó a los 20 ms. Otros autores, que trabajaron con patrones químicos puros y celdas electroquímicas similares a las usadas en este estudio, reportaron que la información proveniente de los procesos farádicos son más relevantes después de los primeros 10 ms (Campos, Alcañiz, Masot, et al., 2012).

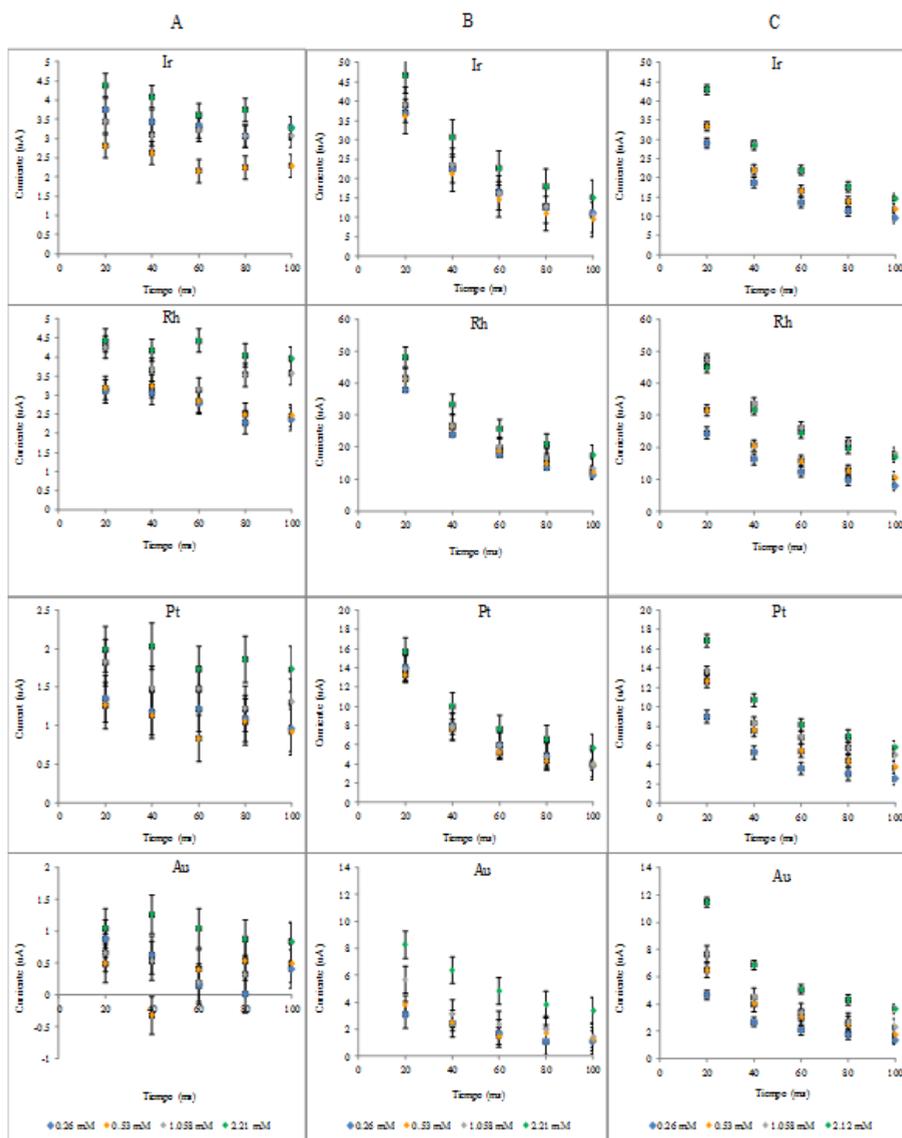


Figura 1. 4. Respuesta voltamétrica, para las secuencias de pulsos 50+ (A), 3+ (B), y 4+ (C), sobre los electrodos de Ir y Rh cuando se aplica el pulso de 800 mV y sobre los electrodos de Au y Pt cuando es de 500 mV, en las disoluciones de aliso.

La Figura I.5 muestra los valores de corriente para todas las concentraciones de aliso a los 20 ms de aplicar el pulso de 500 mV para las tres secuencias de pulsos (50+, 4+ y 3+) y para un valor de corriente obtenida a 500 mV en los voltogramas de voltametría cíclica.

Tal como se esperaba, la voltametría cíclica y la secuencia de pulsos 50+ no permitieron ninguna discriminación entre las diluciones de aliso. Los valores de corriente medidos a 20 ms durante el pulso de 500 mV para la secuencias 3+ y 4+ presentaron una relación lineal con la concentración de aliso. Una vez más los resultados obtenidos por 3+ presentaron mayor dispersión y baja selectividad que los obtenidos por medio de la secuencia de pulsos 4+.

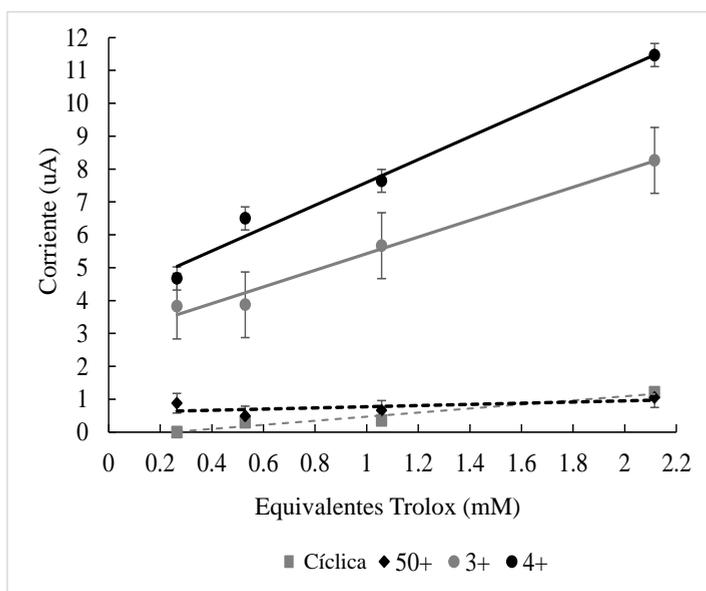


Figura I. 5. Respuesta voltamétrica a los 20 ms durante el pulso de 500 mV para el electrodo de Au sobre la muestra de aliso.

Predicción de la capacidad antioxidante del aliso usando modelos trolox.

Dado que el tren de pulsos 4+ (0, 200, 500 y 800 mV) mostró los mayores niveles de discriminación para la respuesta electroquímica de aliso, esta secuencia de pulsos fue utilizada para desarrollar un modelo de predicción para la capacidad antioxidante del aliso.

La metodología aplicada para construir estos modelos fue similar a la usada en trabajos previos con camu camu (Baldeón et al., 2015), pero en este caso se empleó LWR, y no el procedimiento del análisis PLS. Los modelos fueron construidos y validados con los datos de trolox y posteriormente aplicados a la predicción de las mediciones de aliso. Con la finalidad de evaluar la factibilidad cuando se utilizan todos los electrodos que forman parte de la lengua electrónica voltamétrica o solo los electrodos con los mejores resultados por separado o individualmente, se construyeron varios modelos: uno para cada electrodo noble y otro para la información de todos los metales. En la Tabla I.1 se muestran los resultados de los modelos de trolox por medio de LWR. El modelo más robusto fue el obtenido por medio de los datos del electrodo de Au, mientras los modelos obtenidos para los otros electrodos (Ir, Rh y Pt) presentaron valores más bajos de R^2 y más altos de RMSEP y Bias. El modelo obtenido para todos los electrodos mostró un buen comportamiento, probablemente debido a que el algoritmo del LWR otorgó mayor peso a los datos provenientes del electrodo de Au. De acuerdo con estos resultados, las respuestas voltamétricas obtenidas por medio del electrodo de Au serían suficientes para obtener excelentes modelos de predicción para muestras de trolox.

	Electrodos	Cross-Validación			Predicción		
		RMSECV	CV Bias	R ² CV	RMSEP	Bias	R ²
Modelo Trolox	Au	0.116	-0.004	0.996	0.101	0.002	0.998
	Pt	0.426	-0.059	0.942	0.578	-0.011	0.891
	Rh	0.705	0.029	0.837	1.3	0.372	0.497
	Ir	1.187	-0.194	0.545	0.617	-0.076	0.878
	Metales Nobles	0.134	-0.007	0.994	0.129	-0.035	0.996
Predicción Aliso	Au	0.158	-0.013	0.992	0.641	-0.508	0.951
	Pt	0.384	-0.065	0.953	0.671	-0.065	0.528
	Rh	0.606	0.041	0.879	0.635	-0.197	0.546
	Ir	1.057	-0.249	0.65	1.032	-0.159	0.024
	Metales Nobles	0.309	-0.014	0.97	0.117	-0.013	0.968

Tabla I. 1. Resultados de los modelos generados mediante la regresión localmente ponderada (LWR) para la predicción de aliso, cuando se ha empleado la respuesta voltamétrica de cada uno de los electrodos y la del conjunto de ellos.

Obtenidos los modelos de predicción de trolox, estos fueron aplicados para predecir la capacidad antioxidante de aliso y estas fueron comparadas con las obtenidas mediante el método químico ABTS (10.58 ± 0.73 mM de equivalentes trolox). Los resultados se muestran en la Tabla I.1. El valor de R² obtenido para el electrodo de Au fue también bueno en este caso, pero los valores de RMSEP y Bias fueron muy elevados. Ninguno de los otros tres electrodos dieron resultados aceptables, pero, sorprendentemente, la combinación de los datos de todos los electrodos llevaron a una excelente predicción de la capacidad antioxidante de Aliso.

La Figura I.6 muestra los equivalentes trolox teóricos (mM) del método químico ABTS, vs. los obtenidos mediante la predicción con los modelos LWR desarrollados usando los electrodos de metales nobles (A) y solamente por medio del electrodo de Au (B). Como se observa, la predicción de trolox fue muy buena en los dos casos. Sin embargo, cuando la capacidad antioxidante de aliso fue predicha empleando solamente el electrodo de Au (Figura I.6), pese a que todos los puntos se agrupan muy cerca de la línea de regresión (línea roja en la Figura I.6) los valores predichos fueron más bajos que aquellos medidos, es por lo que los valores de RMSEP y bias fueron muy altos (RMSEP=0.641 y Bias= 0.508). En cambio cuando se realiza la predicción de la capacidad antioxidante de aliso empleando todos los electrodos, la figura resultante muestra todos los puntos prácticamente alineados con la línea de regresión, casi encajando con la línea 1:1.

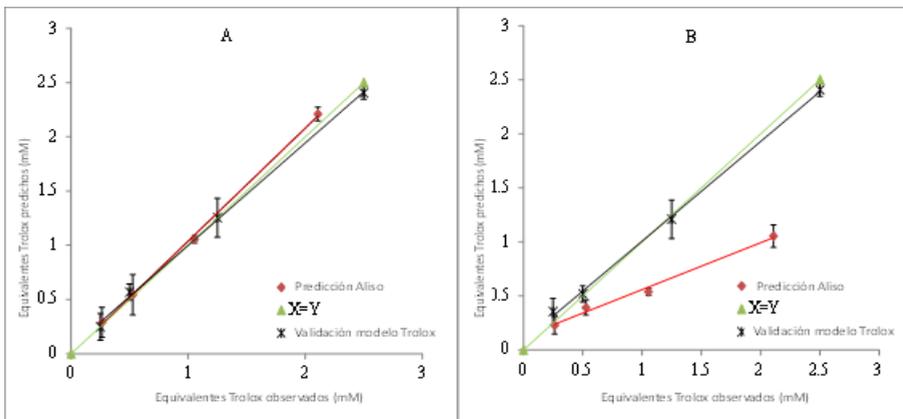


Figura I. 6. Equivalentes Trolox (mL) observados vs. Predichos para las muestras de Trolox y aliso empleando un modelo de predicción matemática basado en la información voltamétrica de los electrodos nobles (A) o del electrodo de oro (B)

La explicación a estos resultados se encuentra en la propia definición de lengua electrónica. Sensores selectivos son muy útiles en aplicaciones donde la señal generada por el sensor es casi exclusivamente relacionada con el compuesto a ser evaluado. A pesar de esto, cuando un electrodo selectivo se usa para cuantificar un compuesto en una cierta matriz compleja de compuestos, su respuesta puede estar influenciada por la presencia de otros compuestos (interferencias). Una lengua electrónica se describe como un grupo de sensores no específicos que presentan una huella electroquímica característica para cada una de las especies en una muestra (sensibilidad cruzada). La combinación de información proporcionada por todos los sensores está afectada por todas las especies presentes en una muestra. El procesamiento de esta información con la correcta herramienta de análisis multivariante puede llevarnos a la cuantificación de uno o más compuestos por medio de compensación de las interferencias de otras especies (Alcañiz et al., 2012). Por esta razón, cuando los modelos trolox, obtenidos a partir de la respuesta voltamétrica sobre el electrodo de oro, se aplicaron para evaluar las muestras de aliso, se obtuvo una linealidad entre los valores medidos y los predichos, debido a la similitud en la respuesta voltamétrica para las dos soluciones (trolox y aliso). Sin embargo, las pequeñas interferencias de los componentes del aliso fueron suficiente para impedir una predicción precisa. En cambio, las pequeñas interferencias podrían haber sido minimizadas cuando se usó la información procedente de todos los electrodos, debido a la cantidad de datos significativos. Esto fue confirmado por el análisis de Q residuales. Los Q residuales, que expresan la falta de ajuste estadístico calculado como la suma de los cuadrados de cada fila de muestras, fueron bajos para los electrodos de Pt y Au a 500 mV y 800mV, lo que está

relacionado con la influencia de los datos obtenidos en estos pulsos/electrodos en el modelo (Figura I.7). Para Ir y Rh, los Q residuales fueron mayores que para el Au y Pt, pero estos valores fueron suficientemente bajos para influenciar ligeramente los modelos para 500 y 800mV.

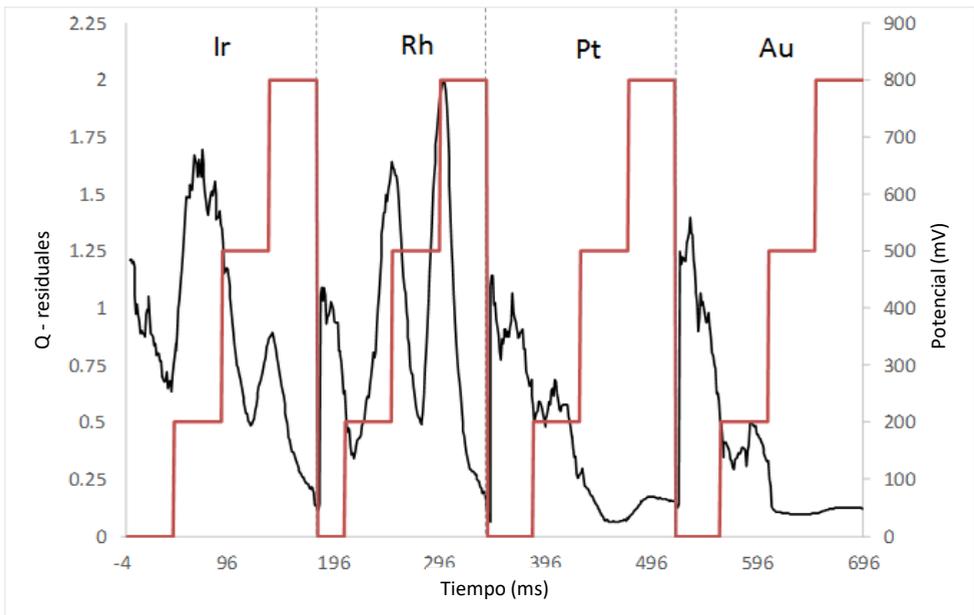


Figura I. 7. Valores de Q residuales para los modelos LWR, empleando la secuencia de pulsos 4+. Línea roja = secuencia de pulsos. Línea negra = valores de Q residuales.

CONCLUSIÓN

La capacidad antioxidante total de aliso ha sido evaluada empleando la lengua electrónica voltamétrica compuesta por sensores construidos a partir de metales nobles (Ir, Rh, Pt, Au). Se ha establecido la importancia de la

configuración del potencial de un pulso para optimizar la respuesta voltamétrica generada por los compuestos presentes en una muestra.

A pesar de que se obtuvo que valores altos de corriente se obtienen cuando se aplica, entre dos pulsos consecutivos, una diferencia de potencial alta, la mejor diferenciación entre concentraciones de muestra se obtuvo con la secuencia de pulsos en la que un pulso intermedio (200mV) se introdujo inmediatamente antes del pulso relevante (500 mV). El pulso intermedio en una secuencia de pulsos permite una mejor reorganización de las cargas de la doble capa electroquímica y evita una sobrecarga de la superficie de los electrodos durante la medición, pero siendo necesario aplicar suficiente potencial para hacer reaccionar a los compuestos presentes en las muestras.

El pulso intermedio redujo la señal proveniente de la componente no farádica mientras se aplicaba el pulso relevante como consecuencia de minimizar la reorganización de las cargas en la superficie del electrodo.

El uso de estos potenciales ha permitido obtener dos modelos para predecir la capacidad antioxidante: uno solo empleando el electrodo Au, mientras que el otro empleando todos los electrodos. Cuando ambos modelos son utilizados para predecir la capacidad antioxidante de trolox (validación de modelos), ambos son bastante precisos, pero sólo el modelo que incluye a todos los electrodos es capaz de predecir correctamente la capacidad antioxidante de las diluciones de aliso. Estos resultados confirmaron las ventajas del uso de varios sensores de sensibilidad cruzada en aplicaciones en las que el compuesto a cuantificar está junto a otros compuestos interferentes.

REFERENCIAS.

- Alcañiz, M., Vivancos, J.-L., Masot, R., Ibañez, J., Raga, M., Soto, J., & Martínez-Máñez, 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. <http://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.01.014>
- Almajano, M. P., Carbó, R., Jiménez, J. A. L., & Gordon, M. H. (2008). Antioxidant and antimicrobial activities of tea infusions. *Food Chemistry*, 108(1), 55–63. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.10.040>
- 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 camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaug) and tumbo (*Passiflora mollisima* (Kunth) L.H. Bailey) juices employing voltammetric electronic tongues. *Food Control*, 54, 181–187. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.01.044>
- Bard, A., & Faulkner, L. (2002). *Allen J. Bard and Larry R. Faulkner, Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*, New York: Wiley, 2001. *Russian Journal of Electrochemistry*, 38(12), 1505–1506. <http://doi.org/10.1023/A:1021637209564>
- Bataller, R., Gandía, J. M., García-Breijo, E., Alcañiz, M., & Soto, J. (2015). A study of the importance of the cell geometry in non-Faradaic systems. A new definition of the cell constant for conductivity measurement. *Electrochimica Acta*, 153, 263–272. <http://doi.org/10.1016/j.electacta.2014.12.014>
- Bhattacharyya, R., Tudu, B., Das, S. C., Bhattacharyya, N., Bandyopadhyay, R., & Pramanik, P. (2012). Classification of black tea liquor using cyclic voltammetry. *Journal of Food Engineering*, 109(1), 120–126. <http://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.09.026>
- Blasco, A. J., González, M. C., & Escarpa, A. (2004). Electrochemical approach for discriminating and measuring predominant flavonoids and phenolic acids using differential pulse voltammetry: Towards an electrochemical index of natural antioxidants. *Analytica Chimica Acta*, 511(1), 71–81. <http://doi.org/10.1016/j.aca.2004.01.038>
- Bussmann, R. W., & Sharon, D. (2009). Shadows of the colonial past - diverging plant use in Northern Peru and Southern Ecuador. *Journal of*

- Ethnobiology and Ethnomedicine. <http://doi.org/10.1186/1746-4269-5-4>
- Campos, I., Alcañiz, M., Aguado, D., Barat, R., Ferrer, J., Gil, L., Vivancos, J. L. (2012). A voltammetric electronic tongue as tool for water quality monitoring in wastewater treatment plants. *Water Research*, 46(8), 2605–2614. <http://doi.org/10.1016/j.watres.2012.02.029>
- Campos, I., Alcañiz, M., Masot, R., Soto, J., Martínez-Máñez, R., Vivancos, J. L., & Gil, L. (2012). A method of pulse array design for voltammetric electronic tongues. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 161(1), 556–563. <http://doi.org/10.1016/j.snb.2011.10.075>
- Centner, V., & Massart, D. L. (1998). Optimization in locally weighted regression. *Analytical Chemistry*, 70(19), 4206–4211. <http://doi.org/10.1021/ac980208r>
- Chan, E. W. C., Lim, Y. Y., Chong, K. L., Tan, J. B. L., & Wong, S. K. (2010). Antioxidant properties of tropical and temperate herbal teas. *Journal of Food Composition and Analysis*, 23(2), 185–189. <http://doi.org/10.1016/j.jfca.2009.10.002>
- Chevon, S., Berry, E. M., Kitrossky, N., & Kohen, R. (1997). Evaluation of plasma low molecular weight antioxidant capacity by cyclic voltammetry. *Free Radical Biology and Medicine*, 22(3), 411–421. [http://doi.org/10.1016/S0891-5849\(96\)00337-1](http://doi.org/10.1016/S0891-5849(96)00337-1)
- Chevon, S., Or, R., & Berry, E. M. (1999). The antioxidant status of patients subjected to total body irradiation. *Biochemistry and Molecular Biology International*, 47(6), 1019–1027.
- Chirinos, R., Pedreschi, R., Rogez, H., Larondelle, Y., & Campos, D. (2013). Phenolic compound contents and antioxidant activity in plants with nutritional and/or medicinal properties from the Peruvian Andean region. *Industrial Crops and Products*, 47, 145–152. <http://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.02.025>
- Cleveland, W., & Devlin, S. (1988). Locally Weighted Regression: An Approach to Regression Analysis by Local Fitting. *Journal of the American Statistical Association*, 83(403), 596–610. Retrieved from <http://www.jstor.org/stable/2289282>
- Eriksson, M., Lindgren, D., Bjorklund, R., Winqvist, F., Sundgren, H., & Lundström, I. (2011). Drinking water monitoring with voltammetric sensors. *Procedia Engineering*, 25, 1165–1168. <http://doi.org/10.1016/j.proeng.2011.12.287>
- Escobar, J. D., Alcañiz, M., Masot, R., Fuentes, A., Bataller, R., Soto, J., & Barat, J. M. (2013). Quantification of organic acids using voltammetric

- tongues. *Food Chemistry*, 138(2–3), 814–820. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.11.078>
- G. Toro, A. L. R., López, F. V., & Taípe, G. M. (2011). Assessment of the Antioxidant Activity of Peruvian Pisco Through Cyclic Voltammetry. *Rev Soc Quim Perú*, 77(2), 127–134.
- García-Breijo, E., Peris, R. M., Pinatti, C. O., Fillol, M. A., Civera, J. I., & Prats, R. B. (2013). Low-cost electronic tongue system and its application to explosive detection. *IEEE Transactions on Instrumentation and Measurement*, 62(2), 424–431. <http://doi.org/10.1109/TIM.2012.2215156>
- Gonzalez, J., Suarez, M., Garcés de Granada, E., & Orozco de Amezquita, M. (2011). Constituyentes antifungicos en nódulos radicales de *alnus acuminata* h.b.k. *Agronomía Colombiana*; Vol. 5, Núm. 1-2 (1988); 83–85 *Agronomía Colombiana*; Vol. 5, Núm. 1-2 (1988); 83–85 2357–3732 0120–9965. Retrieved from <http://revistas.unal.edu.co/index.php/agrocol/article/view/20961>
- Gulaboski, R., Mirčeski, V., & Mitrev, S. (2013). Development of a rapid and simple voltammetric method to determine total antioxidative capacity of edible oils. *Food Chemistry*, 138(1), 116–121. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.10.050>
- Habibi, E., Omidinia, E., Heidari, H., & Fazli, M. (2016). Flow injection amperometric detection of insulin at cobalt hydroxide nanoparticles modified carbon ceramic electrode. *Analytical Biochemistry*, 495, 37–41. <http://doi.org/10.1016/j.ab.2015.11.014>
- Halliwell, B. (1994). Free radicals, antioxidants, and human disease: Curiosity, cause, or consequence? *The Lancet*, 344(8924), 721–724. Retrieved from http://search.proquest.com/docview/199043863?accountid=8630%5Cnhttp://diglib1.bham.ac.uk:3210/sfxlcl3?url_ver=Z39.88-2004&rft_val_fmt=info:ofi/fmt:kev:mtx:journal&genre=article&sid=ProQ:ProQ:nursing&atitle=Free+radicals,+antioxidants,+and+human+disease
- Hoyle, C. H. V., & Santos, J. H. (2010). Cyclic voltammetric analysis of antioxidant activity in citrus fruits from Southeast Asia. *International Food Research Journal*, 17(4), 937–946.
- Ivarsson, P., Holmin, S., Höjer, N. E., Krantz-Rülcker, C., & Winquist, F. (2001). Discrimination of tea by means of a voltammetric electronic tongue and different applied waveforms. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 76(1–3), 449–454. [http://doi.org/10.1016/S0925-4005\(01\)00583-4](http://doi.org/10.1016/S0925-4005(01)00583-4)

- Kang, J., Kim, T., Tak, Y., Lee, J. H., & Yoon, J. (2012). Cyclic voltammetry for monitoring bacterial attachment and biofilm formation. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 18(2), 800–807. <http://doi.org/10.1016/j.jiec.2011.10.002>
- Kuskoski, E. M., Asuero, A. G., Troncoso, A. M., Mancini-Filho, J., & Fett, R. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciência E Tecnologia de Alimentos*, 25(4), 726–732. <http://doi.org/10.1590/S0101-20612005000400016>
- Medina-Plaza, C., de Saja, J. A., & Rodriguez-Mendez, M. L. (2014). Bioelectronic tongue based on lipidic nanostructured layers containing phenol oxidases and lutetium bisphthalocyanine for the analysis of grapes. *Biosensors and Bioelectronics*, 57, 276–283. <http://doi.org/10.1016/j.bios.2014.02.023>
- Pecec, B., Feketefoldi, B., Ribitsch, V., Ortner, A., & Kalcher, K. (2013). Development of an electrochemical sensor for the determination of the total antioxidant capacity in berries based on boron doped diamond. *Journal of Electrochemical Science and Engineering*, 3(1), 1–9. <http://doi.org/10.5599/jese.2012.0024>
- Pereira, P. F., Sousa, R. M. F., Munoz, R. A. A., & Richter, E. M. (2013). Simultaneous determination of ethanol and methanol in fuel ethanol using cyclic voltammetry. *Fuel*, 103, 725–729. <http://doi.org/10.1016/j.fuel.2012.07.034>
- Pohanka, M., Bandouchová, H., Vlčková, K., Karasová, J. Ž. Kuča, K., Damková, V., Pikula, J. (2011). Square wave voltammetry on screen printed electrodes: comparison to ferric reducing antioxidant power in plasma from model laboratory animal (Grey Partridge) and comparison to standard antioxidants. *Journal of Applied Biomedicine*, 9(2), 103–109. <http://doi.org/10.2478/v10136-009-0032-6>
- Pšotová, J., Zahálková, J., Hrbác, J., Šimánek, V., & Bartek, J. (2001). Determination of total antioxidant capacity in plasma by cyclic voltammetry. Two case reports. *Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacký, Olomouc, Czechoslovakia*, 145(2), 81–83.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9–10), 1231–1237. [http://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](http://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)

- Samaniego-Sánchez, C., Inurreta-Salinas, Y., Quesada-Granados, J. J., Blanca-Herrera, R., Villalón-Mir, M., López-García de la Serrana, H., & López-Martínez, M. C. (2011). The influence of domestic culinary processes on the Trolox Equivalent Antioxidant Capacity of green tea infusions. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24(1), 79–86. <http://doi.org/10.1016/j.jfca.2010.06.003>
- Singh, Y. S., Sawarynski, L. E., Dabiri, P. D., Choi, W. R., & Andrews, A. M. (2011). Head-to-head comparisons of carbon fiber microelectrode coatings for sensitive and selective neurotransmitter detection by voltammetry. *Analytical Chemistry*, 83(17), 6658–6666. <http://doi.org/10.1021/ac2011729>
- Tian, S.-Y., Deng, S.-P., & Chen, Z.-X. (2007). Multifrequency large amplitude pulse voltammetry: A novel electrochemical method for electronic tongue. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 123(2), 1049–1056. <http://doi.org/10.1016/j.snb.2006.11.011>
- Wang, J. (2006). *Analytical Electrochemistry, Third Edition*. Analytical Electrochemistry, Third Edition. <http://doi.org/10.1002/0471790303>
- Winquist, F. (2008). Voltammetric electronic tongues - Basic principles and applications. *Microchimica Acta*, 163(1–2), 3–10. <http://doi.org/10.1007/s00604-007-0929-2>
- Ziyatdinova, G. K., & Budnikov, H. C. (2014). Evaluation of the Antioxidant Properties of Spices by Cyclic Voltammetry. *Journal of Analytical Chemistry*, 69(10), 1086–1093. <http://doi.org/10.1134/S1061934814100189>

APÉNDICE

CAPÍTULO I.I.

ESTUDIO DE LA SIMILITUD ENTRE DOS CONFIGURACIONES DE PULSOS DE SIMILAR POTENCIAL PERO DE DIFERENTE NÚMERO DE PULSOS TOTALES.

INTRODUCCIÓN

La respuesta voltamétrica generada por la interacción entre las sustancias presentes en la disolución de una muestra y la superficie de los electrodos se da en función de la configuración del tren de pulsos, pudiendo ser influyentes no solo el potencial del pulso y su duración (tiempo de pulso), sino también el orden en el que los pulsos se ejecutan.

La lengua electrónica voltamétrica es un equipo diseñado por el IDM (Instituto Interuniversitario de Investigación de Reconocimiento Molecular y Desarrollo Tecnológico), el cual es utilizado por diferentes grupos de trabajo, no todos ellos ligados al área de alimentos. Este hecho hizo que se tuviera que diseñar un tren de pulsos que fuese lo suficientemente amplio para que diera cabida a los diferentes estudios que se estaban realizando, pero también lo suficientemente válido para llevar a cabo cada uno de ellos. Así, en este apéndice se evaluó la incidencia que podría tener el utilizar un tren de pulsos más amplio, pero en el que estuviera reflejado el tren de pulsos 4+, estudiado en el capítulo anterior.

MATERIALES Y METODOS

Preparación de muestras

Para la consecución de este estudio se utilizaron dos tipos de muestras, una de Sal (NaCl) diluida en una solución electrolítica a pH 7.4 y una de Ácido ascórbico en solución electrolítica a pH 4.8. Las dos muestras se analizaron en concentraciones de 10 mM, 5 mM, 2.5 mM y 1.25 mM.

Análisis Voltamétrico.

Se realizó por medio de dos configuraciones de pulsos; el tren de pulsos utilizado en el capítulo anterior, denominado 4+ (0, 200, 500, 800 mV), con una duración de 20 ms, y un segundo genérico conformado inicialmente por los 4 pulsos del 4+ y un total de 22 pulsos (0, 200, 500, 800, 900, 500, 300, 0, -50, -400, -450, -500, -600, -650, -800, -850, -650, -600, -550, -400, -200, 0 mV) también con una duración de 20ms cada pulso.

Análisis estadístico

El estudio de comparación de los voltagramas se realizó extrayendo de las respuestas voltamétricas obtenidas utilizando el tren de pulsos genérico, aquella información procedente solamente de los cuatro primeros pulsos. Esta información fue comparada con la obtenida utilizando el tren de pulsos 4+ mediante un análisis de componentes principales (Alcañiz Fillo, 2011).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La figura I.I.1 muestra la respuesta voltamétrica del ácido ascórbico y de la sal (NaCl) cuando se les aplica el tren de pulsos 4+ y el genérico. Para que pueda apreciarse mejor solo se muestran las respuestas obtenidos para las concentraciones 1,25 y 10 mM. Como puede observarse, para ambas concentraciones se produce un solapamiento de las respuestas, no evidenciándose ninguna diferencia entre las respuestas en función del tren de pulsos aplicado.

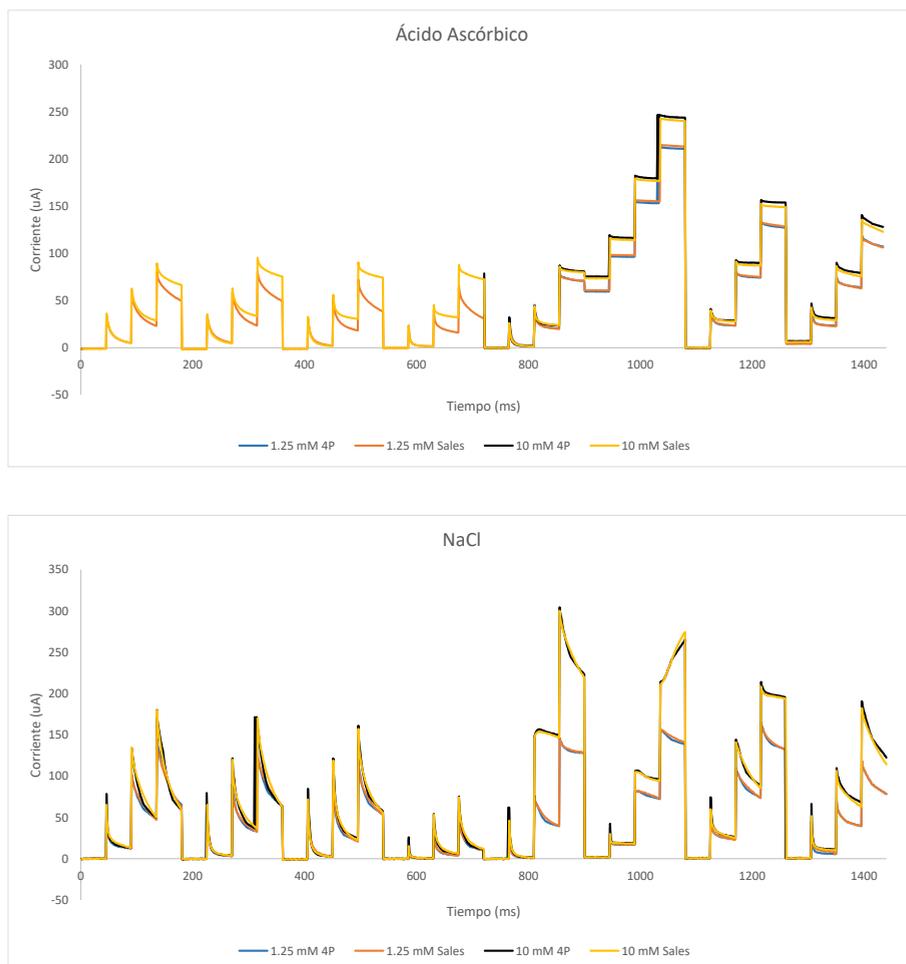


Figura I.I. 1. Comparación de las respuestas voltamétricas obtenidas mediante el tren de pulsos denominado 4+ (0, 200, 500, 800 mV) y el primer segmento de cuatro pulsos obtenido de un tren de pulsos genérico de 22 pulsos.

El análisis comparativo de ambas respuestas mediante un análisis de componentes principales se muestra en la figura I.I.2. En él se ha representado la media y error estándar de los valores de PC1 obtenidos para

cada una de las diluciones. Como se observa, no existen diferencias significativas cuando se comparan los valores de PC1 obtenidos para una misma dilución en función de cómo se han generado, es decir de los valores voltamétricos utilizados (procedentes de los dos trenes de pulsos).

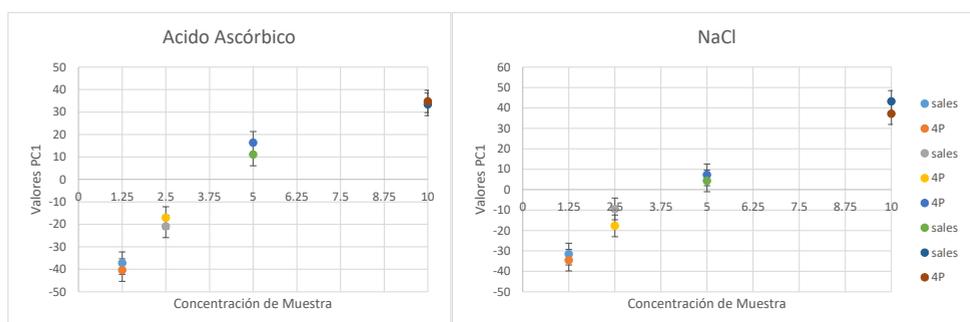


Figura I.I. 2. Comparación de las señales voltamétricas obtenidas para las dos configuraciones de pulsos y cada una de las concentraciones de los analitos sujetos de estudio.

CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos se puede concluir que en el caso de esta configuración de pulsos específicamente, no existe ninguna alteración significativa con la respuesta voltamétrica, es decir que los valores obtenidos para cada uno de los pulsos son relativamente iguales para el segmento de 4 pulsos extraído de la configuración de pulsos constituida por 22 pulsos y la configuración de 4 pulsos inicial.

REFERENCIAS.

Alcañiz Fillol, M. (2011). Diseño de un sistema de lengua electrónica basado en técnicas electroquímicas voltamétricas y su aplicación en el ámbito agroalimentario, 295. Retrieved from <http://tdx.cesca.cat/handle/10803/34322>

CAPÍTULO II

***ESTUDIO DE LA APLICACIÓN DE LA LENGUA
ELECTRÓNICA VOLTAMÉTRICA AL ANÁLISIS
SENSORIAL***

RESUMEN

Cuatro muestras patrón representantes de los sabores ácido, salado, amargo y dulce fueron estudiados por medio de una lengua electrónica voltamétrica a través de un tren de pulsos conformado por 22 pulsos con potenciales entre -1000 y 1000 mV, con la finalidad de determinar si existe alguna reacción electroquímica capaz de diferenciar y caracterizar a cada uno de los sabores estudiados por medio del análisis de loadings y variables. Posteriormente se procedió a testar muestras reales de frutas y café, y a correlacionar las variables que aportan mayor información para la construcción de modelos, con la finalidad de conocer si existe algún tipo de agrupación espontánea entre las respuestas voltamétricas obtenidas de los patrones de sabor y las muestras testadas de acuerdo a sus respectivos sabores. Los resultados mostraron la gran dependencia de la respuesta voltamétrica a la acidez de las muestras testadas, si bien se ha podido discriminar entre sabores e incluso en la mayoría de los casos entre concentraciones lo que ha permitido describir muestras de fruta como camu camu y kiwi, así como de café.

Palabras Clave: Análisis Sensorial, Sabor, Lengua Electrónica,

INTRODUCCIÓN

El análisis sensorial es una de las herramientas más importantes en la industria alimentaria y farmacéutica (Kobayashi et al., 2010), puesto que se relaciona directamente con el desarrollo de nuevos productos o con la detección de características organolépticas alteradas. Para la consecución de

un estudio de análisis sensorial se necesita de personal entrenado, los cuales son capaces de detectar concentraciones de sabor mínimos o máximos, también conocidos como umbrales, llegando a ser capaces de incluso de ordenarlos acorde a la intensidad del sabor. Los umbrales de detección de los sabores básicos en humanos, pueden estar ligados a diferentes factores como por ejemplo: el aporte nutricional de la dieta, la ingesta de carbohidratos (Arbisi, Levine, Nerenberg, & Wolf, 1996), desordenes metabólicos (Obrebowski, Obrebowska-Karsznia, & Gawliński, 2000), el área geográfica de la cual un individuo es originario, tener algún tipo de efecto sobre el límite de detección para algunos de los sabores básicos, incluso el género de la persona puede marcar diferencias significativas entre los umbrales de detección (Hladik & Simmen, 1996). Pero además cada uno de los sabores básicos tiene diferentes umbrales de detección, por ejemplo el sabor amargo tiene el umbral de detección más bajo, mientras que el sabor dulce y el salado poseen un umbral de detección más alto, y el sabor ácido presenta un umbral de detección medio (Deisingh et al., 2004).

Cuando se trabaja con un panel sensorial conformado por personal especializado, es posible excluir algunas de las desventajas de este tipo de análisis, sin embargo surgen otros inconvenientes tales como la fatiga o la posible aparición de estrés, causas que interfieren con la consecución de los objetivos planteados (Scampicchio, Ballabio, Arecchi, Cosio, & Mannino, 2008).

La implementación de análisis instrumental y sensores suele ser poco factible debido a los elevados costos y versatilidad del equipamiento para realizar ensayos (Wyszynski & Nakamoto, 2015). El desarrollo de métodos para

reemplazar parcialmente el panel durante la rutina de trabajo se ha visto como una necesidad para obtener datos confiables, objetivos y repetibles, en corto tiempo y a bajo costo (Buratti, Scampicchio, Giovanelli, & Mannino, 2008). Las aplicaciones en el campo de la industria de alimentaria, se enfocan en dispositivos analíticos, cuyas principales características son la alta sensibilidad, versatilidad y simplicidad (Ivarsson, Holmin, Höjer, Krantz-Rülcker & Winqvist, 2001).

Un equipo de lengua electrónica consiste en la agrupación de diferentes celdas, capaces de detectar sabores (Kinnamon, 2013) como por ejemplo, dulce, ácido, amargo, salado y umami (Deisingh, Stone, & Thompson, 2004) basados en la interacción entre iones de los compuestos analizados y los electrodos de trabajo que conforman la lengua electrónica voltamétrica, simulando el sentido del gusto del ser humano aunque aun así incapaz de evaluar los sabores reales como tal.

Así, si los humanos no están capacitados para distinguir entre cada una de las sustancias químicas como tal, sino que crea un juicio en el cerebro, en base a la interacción entre los compuestos químicos y las papilas gustativas, siendo un impulso conducido por medio de neurotransmisores, los que caracterizan los diferentes sabores (Kiyoshi, 1998), con la lengua voltamétrica que se describe como un grupo de sensores no específicos cuya información proporcionada por todos ellos está afectada por todas las especies presentes en una muestra (Alcañiz et al., 2012) podría ser utilizada para describir alimentos líquidos.

En base a lo expuesto se plantea como objetivo evaluar la capacidad de la lengua electrónica para su utilización en análisis sensorial, más

concretamente como equipo capaz de ser usado en un cribado inicial de muestras antes de ser evaluadas por un panel de catas.

MATERIALES Y METODOS

Preparación de las muestras

Las muestras de los patrones de los 4 sabores básicos se prepararon en base a los umbrales sensoriales establecidos y testados en estudios previos para detección en humanos (Mojet, Christ-Hazelhof, & Heidema, 2001). Se emplearon disoluciones de sacarosa como patrón para el sabor dulce, NaCl para el sabor salado, ácido cítrico como sabor ácido y cafeína como sabor amargo, cada una de ellas en concentraciones de 1.25mM; 2.5mM; 5mM y 10mM, diluidas en una solución electrolítica o tampón fosfato de potasio 0.01mM, y el pH se ajustó a 4.8 o 7.4 dependiendo de la naturaleza química del compuesto.

Con la finalidad de conocer la capacidad descriptiva de la Lengua electrónica Voltamétrica, se evaluaron muestras de frutas conocidas y café. En el caso de las frutas estas fueron Camu Camu (*Myrciaria dubia*) y kiwi (*Actinidia deliciosa*). La elección de estas se basó en su alto contenido en antioxidantes así como por su carácter ácido generado por ácidos orgánicos como el ácido cítrico (Chirinos, Galarza, Betalleluz-Pallardel, Pedreschi, & Campos, 2010; Leontowicz et al., 2016). Para su preparación, la pulpa fue triturada, después de ser peladas y eliminadas las semillas en el caso del camu camu. Los extractos obtenidos se centrifugaron a 10,000 rpm por 10 minutos a 4°C y los zumos resultantes fueron almacenados a -40°C para análisis posteriores. Para obtener las diferentes concentraciones a analizar, los extractos se diluyeron

en una solución electrolítica de fosfato de potasio 0.01mM a pH 4.8 debido a su pH ácido, en concentraciones de 0.5, 1, 2 y 3% v/v para el camu camu y 2.5, 5, 7.5 y 10 % v/v para el kiwi. Dado que estas frutas también fueron utilizadas en otros estudios, realizados por el grupo de trabajo (Baldeón, 2015), en los que además se caracterizaron fisicoquímicamente, en la Tabla II.1. Se muestran los valores promedio y desviación estándar obtenidos.

Tabla II. 1 Propiedades Físico químicas de Kiwi y Camu Camu

	Kiwi	Camu Camu
Acidez total titulable (Eq. AC/100mL zumo)	1.182±0.018	4.459±
Ácido Ascórbico (mg/L)	896.40	26442
Equivalentes Ácido Ascórbico (mM EAA)	8.02±0.44	283.70±36.80
Glucosa (g/100 mL zumo)	2.36±0.46	0.37±0.05
Fructosa (g/100 mL zumo)	3.0±0.7	0.65±0.11
Sacarosa (g/100 mL zumo)	0.27±0.04	-
Glucosa-Fructosa (g/100 mL zumo)	0.78	0.57
Azúcares Totales (g/100 mL zumo)	5.67	1.02

La muestra de café se obtuvo disolviendo 5gramos de café soluble (Nespresso Classic) en 320 mL de agua a 80 °C, obteniendo así una concentración aproximada de 2.53mM de cafeína en la disolución. Esta solución se dejó enfriar a temperatura ambiente para posteriormente diluirla a dos concentraciones de 25 (0.63mM) y 50 (1.27mM) % (v/v) del café en la solución electrolítica fosfato de potasio 0.01 mM. A pesar de que el pH del café se encuentra alrededor de 5 y pertenecería a la gama de alimentos ácidos (pH 0 a 7), al utilizar un café soluble el pH de la solución fue similar al del agua utilizada, por lo que se consideró realizarlo a pH 7.4.

Determinaciones electrónicas. Voltametría de pulsos por medio de la lengua electrónica

Las mediciones de voltametría de pulsos se realizaron por medio de un sistema electrónico y su correspondiente software, ambos elaborados por el Instituto de reconocimiento molecular y desarrollo tecnológico de la Universidad Politécnica de Valencia, cuyo funcionamiento se ha explicado previamente en el apartado de introducción.

La configuración del equipo para la consecución de esta experiencia consiste en un tren de pulsos genérico que consta de 22 pulsos con una duración de 20ms por pulso y valores de potencial entre -800mV y 900mV, para cada uno de los electrodos de trabajo (Ir, Rh, Pt, Au, Ag, Co, Cu y Ni.). Como resultado de cada pulso se obtienen alrededor de 45 lecturas de la señal de la corriente, sumando un total de 7920 datos por cada medición (45 lecturas por pulso, 22 pulsos y 8 electrodos).

Para la realización de las lecturas, los electrodos fueron introducidos unos 2 centímetros en el interior de las muestras, y tras cada una de las mediciones se procedió a realizar la limpieza de estos mediante el papel de lija mínimamente abrasivo y el óxido de aluminio.

Análisis estadístico

Dado que en el estudio no se pretende la cuantificación de los sabores, sino que lo que busca es conocer si existe algún tipo de relación entre la respuesta electroquímica y el sabor que se exprese, los métodos estadísticos multivariante utilizados (análisis de componentes principales PCA y regresión de mínimos cuadrados parciales PLS) han estado utilizados a tal fin. Además, en aquellos casos en los que se ha pretendido evaluar la diferencia estadística

entre datos, se ha utilizado el análisis de varianza (ANOVA), con un nivel de significancia del 95%.

El estudio fue realizado por cuadruplicado, siendo cada uno de los ensayos evaluado por quintuplicado, es decir que en el caso de los patrones, éstos se prepararon 4 veces y cada uno de ellos fue evaluado 5 veces. Éste mismo diseño fue aplicado a las muestras de café.

En el caso de las frutas, a partir del extracto congelado se prepararon las 4 muestras que fueron las que se evaluaron 5 veces.

Para la realización del estudio se ha utilizado la herramienta estadística Toolbox 6.3 (Eigenvector Research Inc., Wenatchee, Washington, USA), una extensión en el ambiente computacional R2012a (The Mathworks, Natick, Massachusetts, USA).

Estudio de la respuesta voltamétrica para las mediciones realizadas en los 4 sabores básicos

Evaluación de la respuesta voltamétrica en función de la concentración

Con la finalidad de determinar la relación entre la respuesta voltamétrica obtenida del análisis individual de cada uno de los patrones de sabor y su respectiva concentración de analitos, se procesan los datos de cada muestra patrón y sus distintas concentraciones por medio de un PCA, que nos permitirá observar una agrupación espontánea de muestras basado en la máxima varianza que existe entre ellas, además de permitirnos detectar comportamientos atípicos o extraños a lo largo del ensayo.

Obtención de los electrodos y pulsos más influyentes en la relación respuesta voltamétrica - concentración

Una vez analizados las muestras patrones de forma individual, y con la finalidad de evaluar que metales (electrodos) fueron los más influyentes para definir el comportamiento de las agrupaciones espontaneas observadas en el PCA, se llevó a cabo un PLS para conocer la correlación existente entre las respuestas voltamétricas de las muestras patrones y la concentración de analitos presentes.

Con el análisis PLS no se pretende obtener un modelo de predicción sino obtener los VIP's (Variable importance in projection – Importancia de variables en proyección) de los loadings, los cuales nos dan información de cuáles son los segmentos (electrodos y pulsos) que más contribuyen en la construcción del modelo que relaciona respuesta voltamétrica con concentración de la disolución.

Así VIP puntúa las variables tomando en cuenta que si son menores que 1 en la escala de Y se pueden despreciar del análisis PLS, permitiendo realizar los modelos en base solo a esta selección VIP, lo que nos permitir realizar una selección de variables (Chong & Jun, 2005).

Mediante este tratamiento se reduce en gran manera la cantidad de información a procesar, trabajando con un menor volumen de datos, lo cual reduce el tiempo de procesado, pero además con la eliminación datos (respuestas electrónicas) que aporta poca o ninguna información muchas veces también se elimina información denominada ruido que en algunos casos empeoran los modelos de predicción.

Obtenidos los segmentos influyentes (electrodos-pulsos) se volvió a realizar el estudio de PCA en el que se evalúa la relación respuesta electrónica-concentración. Con este nuevo estudio se busca mejorar la interpretación de la relación existente.

Evaluación de la respuesta voltamétrica en función del compuesto

Una vez analizada la posible relación respuesta voltamétrica – concentración del compuesto, se procedió a evaluar si la respuesta voltamétrica es suficientemente característica del compuesto usado como muestra patrón, como para ser discriminado del resto de compuestos evaluados. Para ello se realizó nuevamente un PCA en el que se evaluó la respuesta voltamétrica de los compuestos, pero esta vez en conjunto. Posteriormente se analizó la matriz de datos con los segmentos influyentes obtenidos del estudio de los loadings por medio del VIP.

Evaluación de las características de sabor de las frutas y café

Finalmente se evalúan dos muestras de fruta y una muestra de café, por medio de un PCA incluyendo también las muestras patrón de sabor. Con el estudio se pretende evaluar las tendencias de las muestras para agruparse con los patrones de acuerdo a su “sabor”, si bien en el caso de la lengua la agrupación es por la naturaleza reactiva de los compuestos.

RESULTADOS Y DISCUSION

Estudio de la respuesta voltamétrica para las mediciones realizadas en los 4 sabores básicos

Evaluación de la respuesta voltamétrica en función de la concentración

Una vez realizadas las mediciones voltamétricas en cada uno de los 4 sabores básicos, las matrices de datos obtenidos fueron tratadas de forma individual, y así conocer si el equipo es capaz de diferenciar entre las concentraciones de analito presente en cada de ellas y atribuidas a su respuesta electroquímica (Tabla II.1). De los cuatro sabores evaluados, el sabor ácido es el que mostró una mejor agrupación espontanea de las lecturas en función de la concentración de la disolución, con una varianza total acumulada (4 componentes) del 90.38%, en la que la primera componente principal marcó la tendencia de agrupación, un 72.23% de varianza recogida.

Otro de los sabores que mostró una buena agrupación entre muestras fue el sabor amargo con un 70.51% de varianza total recogida en tres componentes, donde el PC1 recogió un 49.19% de varianza. El sabor dulce, en orden de varianza acumulada, fue el tercero con 63.96% (3 componentes principales), donde la PC1 recogió 54.14%. Finalmente, el sabor salado, con la menor de las varianzas totales acumuladas, un 59.88% en 3 componentes y con una PC1 de 30.09% de varianza recogida, fue el que menor discriminación tuvo. No obstante, como se aprecia en la Figura II.1, se dio una discriminación entre las muestras en función de su concentración, si bien para las menores de las concentraciones la discriminación vino dada por la PC2.

Tabla II. 2. Resultados obtenidos para el estudio de PCA realizado sobre las lecturas voltamétricas realizadas sobre los 4 sabores básicos.

Porcentaje de varianza recogido por el modelo PCA				
Muestra	Nº PC	Covarianza (X)	% Varianza	% Σ Varianza
Salado (NaCl)	1	2.38E+03	30.09	30.09
	2	1.25E+03	15.74	45.83
	3	1.11E+03	14.05	59.88
Dulce (Sacarosa)	1	3.45E+03	43.51	43.51
	2	8.42E+02	10.63	54.14
	3	7.78E+02	9.82	63.96
Acido (Ácido Cítrico)	1	5.72E+03	72.23	72.23
	2	7.59E+02	9.59	81.82
	3	4.36E+02	5.51	87.33
	4	2.78E+02	3.5	90.83
Amargo (Cafeína)	1	3.90E+03	49.19	49.19
	2	9.40E+02	11.87	61.06
	3	7.49E+02	9.45	70.51

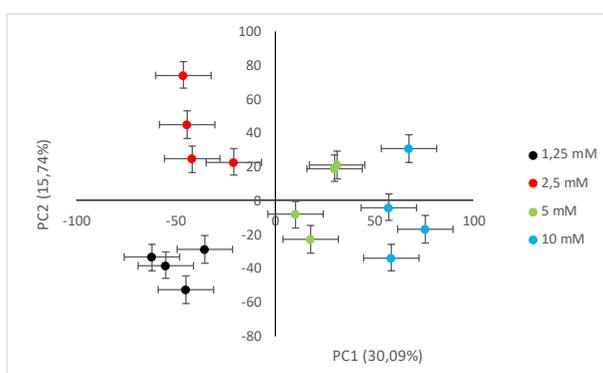


Figura II. 1. Representación gráfica de la componente principal 1 (PC1) y la componente principal 2 (PC2) para el estudio de componentes Principales (PCA) de las lecturas voltamétricas realizadas sobre las muestras de NaCl.

Obtención de los electrodos y pulsos más influyentes en la relación respuesta voltamétrica - concentración

Para obtener que parte de la información voltamétrica (electrodos y pulsos) analizada es la que aporta la mayor información para la agrupación de las muestras, se procedió al análisis de Loadings y VIP obtenidos al realizar un estudio de PLS.

En la Tabla II.3 se muestran los valores de correlación (R^2), así como los de la suma de errores cuadráticos (RMSEC) y el Bias, tanto para el estudio PLS realizado con la totalidad de la información voltamétrica como el realizado solo con la información procedente de la selección VIP obtenida por el primer PLS. Como se observa, el estudio de PLS mostró en general buenas correlaciones, las cuales fueron mejores cuando éste se realizó únicamente con los valores de la selección VIP. Para algunos patrones la mejora fue notable, como por ejemplo en el sabor dulce, en el que la correlación de Cross Validación pasó de 0.831 a 0.922. Las medidas que presentaron una menor correlación fueron las realizadas sobre el sabor amargo, con unos R^2 de 0.863 y 0.895 respectivamente. Finalmente, la que mayores valores de R^2 presentó fue el sabor salado con valores de correlación de Cross validación de 0.976 a 0.978.

Tabla II. 3. Resultados de los estudios de PLS realizados con la totalidad de la información voltamétrica y los obtenidos para el realizado solo con los datos provenientes de la selección VIP del primer PLS.

Sabor		PLS (datos totales)	PLS (Segmento VIP)
Salado (NaCl)	Num. LVs:	3	3
	RMSEC	0.1159	0.0625
	Bias	-8.88E-16	3.55E-15
	R ² C	0.999	0.999
	RMSECV	0.8198	0.6988
	CV Bias	-0.0907	-0.0189
	R ² CV	0.945	0.957
Dulce (Sacarosa)	Num. LVs:	6	4
	RMSEC	0.7755	1.4285
	Bias	0.0000	0.0000
	R ² C	0.9962	0.9871
	RMSECV	0.8309	3.5308
	CV Bias	0.2020	0.1874
	R ² CV	0.831	0.922
Ácido (Ácido Cítrico)	Num. LVs:	3	3
	RMSEC	0.1291	0.1245
	Bias	-8.88E-16	-8.88E-16
	R ² C	0.9985	0.9986
	RMSECV	0.5632	0.4977
	CV Bias	-0.0485	-0.0287
	R ² CV	0.976	0.978
Amargo (Cafeína)	Num. LVs:	3	3
	RMSEC	1.9963	2.0227
	Bias	1.07E-14	-3.55E-15
	R ² C	0.9748	0.9741
	RMSECV	4.6604	4.0883
	CV Bias	-0.0585	-0.0251
	R ² CV	0.863	0.895

La mejora en los resultados del PLS cuando se usan los datos seleccionados por el VIP, obtenidos en un primer PLS realizado con todos los datos voltamétricos, puede ser debido a la eliminación de información que podríamos denominar “ruido” y que estaría enmascarando el resto de información (Mathematics, 2014; Palermo, Piraino, & Zucht, 2009).

La caracterización de las respuestas voltamétricas como resultado del análisis VIP, para cada uno de los patrones químicos analizados y electrodos de trabajo, se muestran en las Figuras II.2., II.3. y II.4. En ellas se puede ver la importancia o influencia que tienen cada una de las variables en la construcción del primer modelo PLS. Mediante una línea anaranjada se muestra el tren de pulsos utilizado y en negro el valor de los VIP superiores a 1. Además, en cada una de las figuras se muestra la respuesta obtenida para la configuración de todos los pulsos en la totalidad de los electrodos (A) y para los electrodos más influyentes (A*).

Una vez analizados los voltagramas y loadings, en el caso del sabor salado (Figura II.2), el electrodo de plata es el que mayor peso VIP presenta, para la totalidad de los pulsos aplicados (Figura II.2-A*), si bien también lo fue el de Co. Este resultado sería debido a la propia naturaleza electroquímica que posee el Cloruro de sodio con el electrodo de plata para interactuar y que generaría compuestos como el cloruro de plata (Hassan, Ibrahim, Rehim, & Amin, 2010).

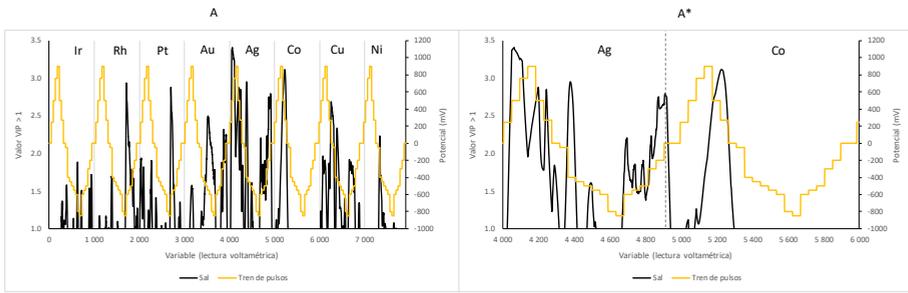


Figura II. 2. Representación del análisis VIP para el sabor salado (A) y de unos de los electrodos más influyentes (A*). — Tren de pulsos; — Segmento Vip.

En el caso del sabor dulce, éste se caracterizó principalmente por el grupo de electrodos formados por metales nobles Ir, Rh, y Au (Figura II.3. A), destacando entre estos el electrodo de oro específicamente en la zona de pulsos negativos (Figura II.3.-A*). Este resultado podría venir dado por el efecto catalítico que el oro generaría en la reducción de los azúcares (Ben Aoun et al., 2003; Burke & Nugent, 1998). Además, el electrodo de Ni también presentó valores importantes de VIP.

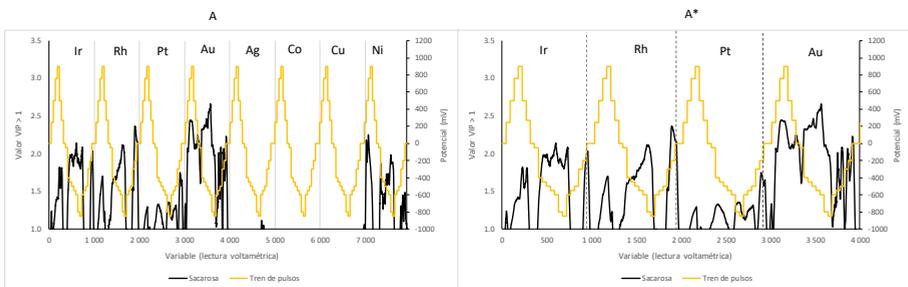


Figura II. 3. Representación del análisis VIP para el sabor dulce (A) y de unos de los electrodos más influyentes (A*). — Tren de pulsos; — Segmento Vip.

Para el sabor ácido (Figura II.4.), también fueron los formados por los metales nobles los que en mayor medida aportaron información al modelo PLS (Figura II.4.-A*), si bien los electrodos formados por metales no nobles, fundamentalmente el Co tuvieron influencia en el modelo.

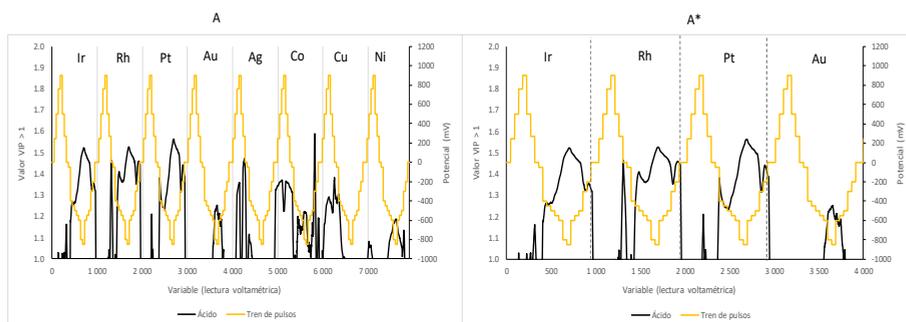


Figura II. 4. Representación del análisis VIP para el sabor ácido (A) y de unos de los electrodos más influyente (A*). — Tren de pulsos; — Segmento Vip.

Los electrodos de metales nobles en especial el platino (Figura II.5.-A) y el de plata (Figura II.5.-A*) fueron los que aportaron un mayor volumen de información válida para la construcción de un modelo de cuantificación del sabor amargo.

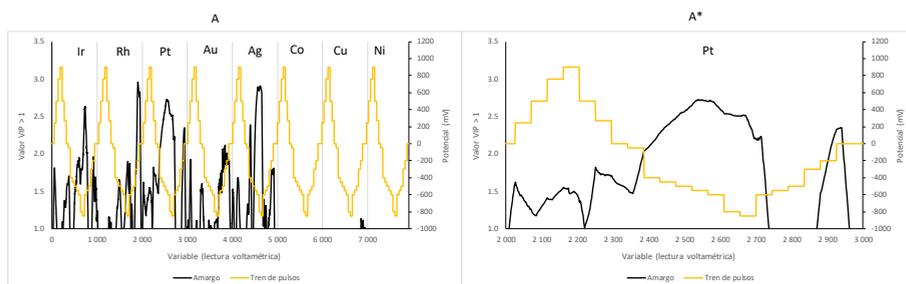


Figura II. 5. Representación del análisis VIP para el sabor amargo (A) y de uno de los electrodos más influyente (A*). — Tren de pulsos; — Segmento Vip.

Las zonas más influyentes correspondientes a un electrodo son aquellas que permiten una marcada discriminación entre concentraciones de un mismo patrón de sabor. Por ejemplo, en la Figura II.6. se representa el segmento cuando se aplica el pulso a 500mV durante 20ms en el electrodo de Ag durante el análisis de la muestra patrón de sabor salado a diferentes concentraciones. Como se puede apreciar existe una discriminación de las respuestas en función de la concentración del analito evaluado.

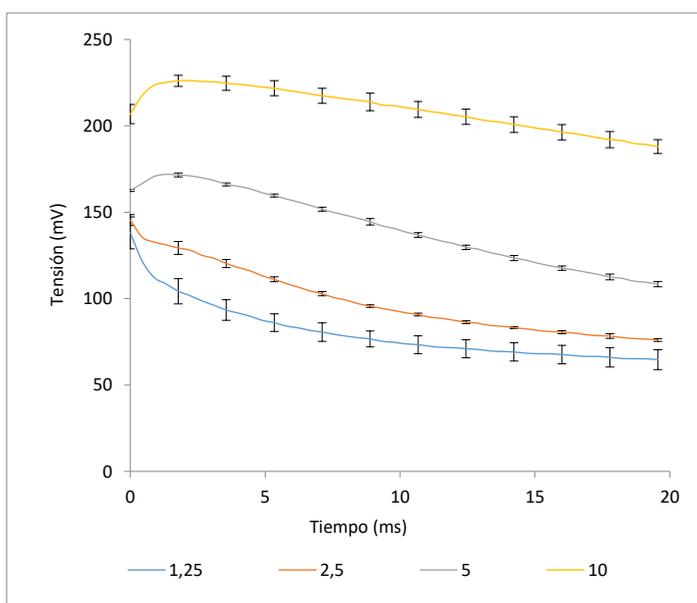


Figura II. 6. Señal extraída del análisis de NaCl (patrón sabor salado) durante el pulso de 500mV en el electrodo de Plata.

Una vez obtenidos los segmentos VIP para cada sabor y visto que incluso estos pueden mejorar la agrupación espontánea en función de la concentración de la disolución, éstos fueron utilizados para analizar nuevamente el estudio de PCA por sabores. La tabla II.4. recoge los resultados del estudio. Cuando se comparan estos resultados con los obtenidos para el estudio inicial de PCA, con toda la información voltamétrica (Tabla II.2.), se evidenció un incremento en los porcentajes de varianza total capturada y en algunos casos con un menor número de componentes principales. Así en el caso del sabor salado la mejora fue muy sustancial, pasando de un valor de 59.88%, con 3 componentes principales, a 99,52% de varianza total también con 3 componentes. La figura II.7. muestra la nueva agrupación espontánea de las muestras en la que se puede apreciar la agrupación de las muestras en función de la concentración, existiendo diferencias significativas entre las diferentes concentraciones.

En el caso del sabor dulce la mejoría fue muy notable, pasando de un valor de 54.14%, en 3 componentes, al de 93.61% de varianza recogida en 3 componentes. Para el estudio con el sabor ácido, los valores del sabor fueron de un valor de 90.83 de varianza total capturada, con 4 componentes, a un 99.61% de varianza total recolectada con 3 componentes principales. Finalmente, el sabor amargo pasó de 82.7%, en 4 componentes, a un 84.52% de varianza en 3 componentes principales.

Tabla II. 4. Resultados obtenidos del análisis de componentes principales de la matriz de datos correspondiente a los 4 sabores analizados utilizando la selección de datos del segmento VIP.

Porcentaje de varianza recogido por el modelo PCA				
Muestra	Nº PC	Covarianza (X)	% Varianza	% Σ Varianza
Salado (NaCl)	1	1,01E+002	94,05	94,05
	2	5,01E+001	4,68	98,73
	3	8,51E+001	0,8	99,52
Dulce (Sacarosa)	1	6,26E+02	87,44	87,44
	2	2,37E+01	3,32	90,76
	3	2,04E+01	2,85	93,61
Acido (Ácido Cítrico)	1	7,18E+02	99,28	99,28
	2	1,47E+00	0,2	99,48
	3	9,63E-01	0,13	99,61
Amargo (Cafeína)	1	1,87E+03	61,18	61,18
	2	2,99E+02	9,79	70,97
	3	2,46E+02	8,07	79,04

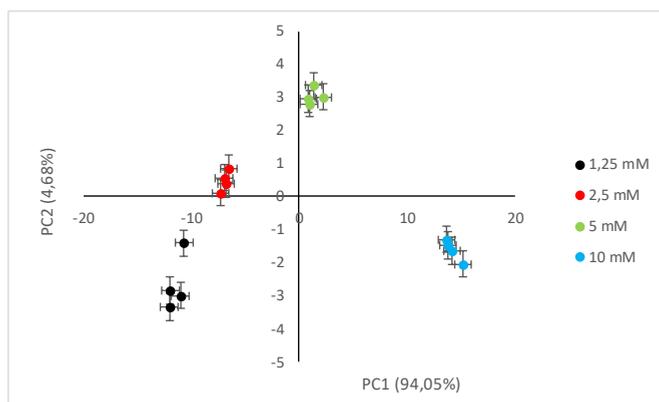


Figura II. 7. Representación gráfica de la componente principal 1 (PC1) frente a la componente principal 2 (PC2) para el estudio de componentes principales (PCA) de las lecturas voltamétricas, de los segmentos VIP, realizadas sobre las disoluciones de NaCl.

Por medio de la utilización de estos segmentos de variables influyentes, aparte de mejorar los resultados también se dio una reducción significativa del volumen de datos a procesar, siendo estas reducciones, expresadas en tanto por cien, de 37%, 39%, 41% y 58% para el sabor amargo, dulce, salado y ácido respectivamente.

Evaluación de la respuesta voltamétrica en función del compuesto

La evaluación de la respuesta voltamétrica en función del compuesto se realizó mediante el procesado en conjunto de la totalidad de los datos, es decir, mediante la matriz formada por todos los datos voltamétricos obtenidos para los 4 sabores básicos. Además, el estudio también se realizó de forma similar, pero en este caso no con la totalidad de los datos sino con los provenientes de la selección VIP de cada sabor.

Los resultados de los PCA's se muestran en la tabla II.5. En ambos estudios los valores de la varianza total recogida fueron muy similares, si bien cuando el estudio fue realizado con todos los datos, el valor de la varianza total recogida fue de 82.7%, con el empleo de 4 componentes principales. En cambio, cuando se empleó la información procedente solo de la selección VIP, el valor obtenido fue de 84.52%, pero en este caso solo utilizando 3 componentes principales.

La figura II.8., a modo de ejemplo de los dos PCA's, muestra las tres primeras componentes del estudio de PCA realizado con la totalidad de los datos voltamétricos. Con la finalidad de hacerla más visual solo se muestra el centroide para cada muestra y concentración. Como se aprecia, la primera componente (PC1), con un 49.57% varianza, discriminó fundamentalmente

el sabor ácido del resto de sabores. Para el resto, fueron la combinación de las 4 componentes quienes facilitaron su discriminación. Si bien en el gráfico se aprecia que las agrupaciones quedan discriminadas también por la concentración, el análisis estadístico ANOVA entre los valores de los PC's, en algunos casos (fundamentalmente para las concentraciones bajas de cafeína y sacarosa) no mostraron diferencias significativas ($p\text{-value} < 0.05$) entre concentraciones.

Tabla II. 5. Resultados PCA de todos los sabores básicos utilizando todo el voltograma o solo la información procedente de los VIP's.

<i>Porcentaje de varianza recogido por el modelo PCA</i>				
<i>Muestra</i>	<i>Nº PC</i>	<i>Covarianza (X)</i>	<i>% Varianza</i>	<i>% Σ Varianza</i>
<i>PCA Total</i>	1	3.93E+03	49.57	49.57
	2	1.31E+03	16.56	66.13
	3	7.06E+02	8.91	75.04
	4	6.07E+02	7.66	82.7
<i>PCA con puntos influyentes (VIP)</i>	1	1.56E+03	47.73	47.73
	2	8.78E+02	26.63	74.36
	3	3.82E+02	10.16	84.52

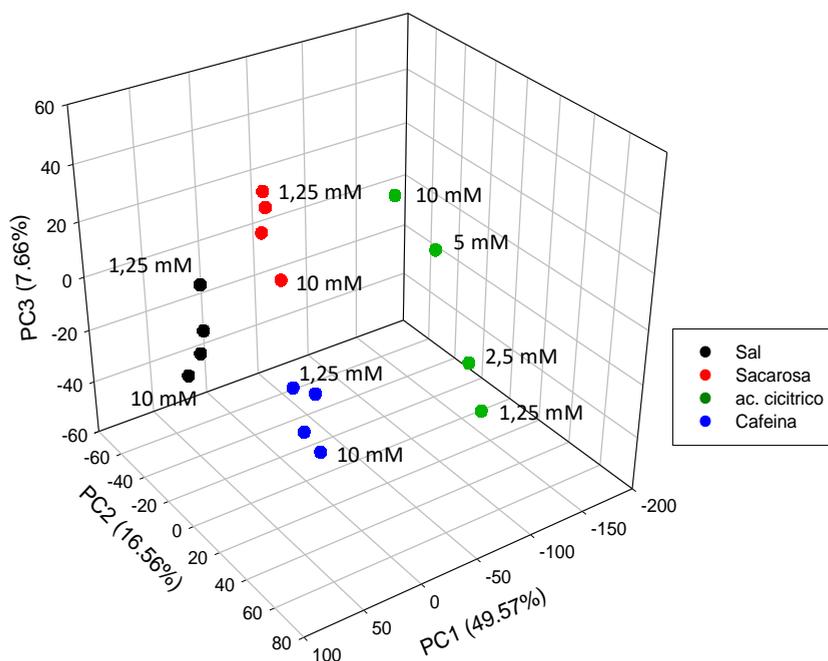


Figura II. 8. PCA de los 4 sabores básicos utilizando todos los datos.

Evaluación de las características de sabor de fruta y café

Dada la dependencia de la respuesta voltamétrica al pH de la disolución evaluada, como se ha observado en el estudio anterior, para el estudio de las frutas y el café, este se dividió en dos. Por un lado, las frutas las cuales están en un medio electrolítico ácido y por otro el café que se encuentra en el medio electrolítico neutro.

Evaluación de las características de sabor de fruta

El análisis de componentes principales (PCA) de los sabores con las dos muestras de zumos de fruta dio como resultado 7 componentes principales que recogieron un 92.17% de varianza total, pese a que con el análisis de las primeras 3 componentes fue suficiente para conocer las tendencias de

agrupación. Como se muestra en la Figura II.9., en la que se ha representado la PC1 con un 46.48% vs PC2 con un 20.32% de varianza recogida, las muestras de fruta se situaron cercanas al patrón ácido (sector positivo del eje X). Este resultado fue lógico dado el carácter ácido de las muestras (Tabla II.2.), lo que explicaría en parte la agrupación más cercana de las muestras de camu camu que las de kiwi al patrón ácido, pues esta presenta una mayor acidez titularle que el kiwi (Tabla II.1.).

Cuando se representa la PC2 vs PC3 (Figura II.10.) se observa como las muestras de fruta tendieron a una agrupación distinta. Mientras las muestras de camu camu y las concentraciones más bajas del ácido evolucionaron hacia valores negativos de la PC3, el kiwi junto con el patrón sacarosa quedaron encuadradas el positivo de la PC3 y de la PC2. Este resultado podría estar ligado a la mayor concentración en azúcares del kiwi. Como se observa en la Tabla II.1., la cantidad de azúcares del kiwi es mucho mayor que la del camu camu, situándose este último en la parte opuesta al patrón sacarosa.

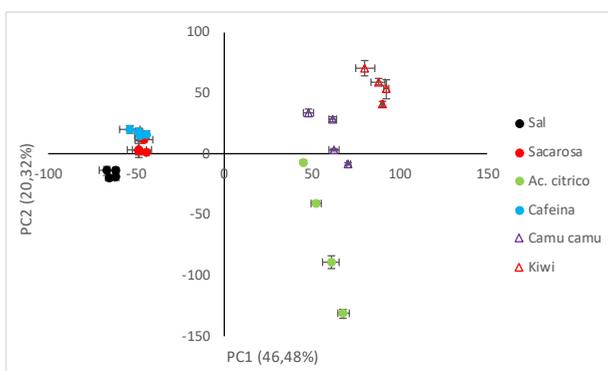


Figura II. 9. Representación gráfica de la componente principal 1 (PC1) frente a la componente principal 2 (PC2) para el estudio de componentes principales (PCA) de las lecturas voltamétricas realizadas sobre los patrones y frutas.

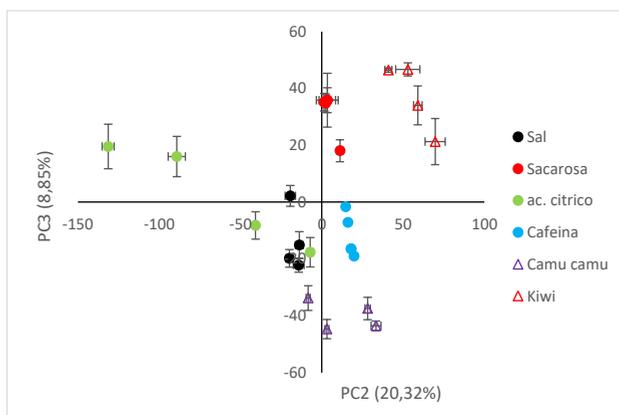


Figura II. 10. Representación gráfica de la componente principal 2 (PC2) frente a la componente principal 3 (PC3) para el estudio de componentes principales (PCA) de las lecturas voltamétricas realizadas sobre los patrones y frutas.

Una vez analizados los datos y con la finalidad de minimizar el efecto del sabor ácido sobre la matriz del PCA y comprobar los resultados observados, se procedió a realizar el mismo análisis de PCA, pero en este caso suprimiendo las lecturas del patrón ácido. Como se observa en la Figura II.11.-A, se produjo una clara diferenciación de las frutas con respecto a los sabores dulce, amargo y salado con un 54.57% de varianza recogida por PC1, evidenciándose la influencia de la acidez sobre el estudio. En cambio, cuando se representa la PC2 vs PC3 (Figura II.11.-B) las muestras de fruta se separaron la una de la otra, localizándose el kiwi en la zona positiva del eje X cercano a los sabores dulce y el camu camu en el sector opuesto. La explicación a este comportamiento la podemos encontrar en la respuesta voltamétrica para la sacarosa, camu camu y kiwi (Figura II.12.). Como se

aprecia en la figura II.12. en la que se muestra los tres segmentos VIP en el electrodo de oro, así como el tren de pulsos. Como se observa en el tramo en el que se aplicaron pulsos negativos, los valores VIP fueron máximos para la sacarosa, siendo también importantes para el kiwi, no tanto para el camu camu. La mayor importancia de este segmento reflejaría una mayor reactividad la cual podría estar ligada al efecto catalítico que el oro generaría en la reducción de los azúcares (Ben Aoun et al., 2003; Burke & Nugent, 1998).

Tras realizar un análisis del PLS para el camu camu y el kiwi, de igual forma que se realizó para la sacarosa (Tabla II.2.), y de obtener los segmentos influyentes VIP, al igual que se hizo para la sacarosa (Figura II.3.), se procedió a compararlos. La comparación se centró en el tramo en el que el VIP mostró mayor valor para la sacarosa, el comprendido en el electrodo de oro (Figura II.3.).

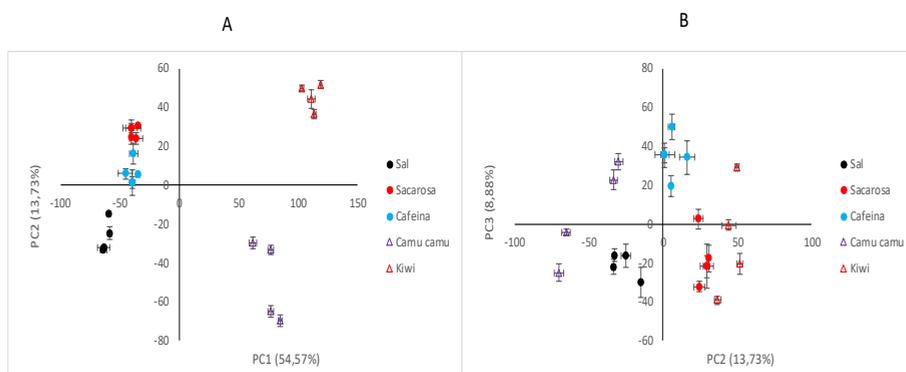


Figura II. 11. Representación gráfica de la componente principal 1 (PC2) frente a la componente principal 2 (PC2) (A) y PC2 frente a PC3 (B) para el estudio de componentes principales (PCA) de las lecturas voltamétricas realizadas sobre los patrones y frutas (exceptuando el patrón ácido).

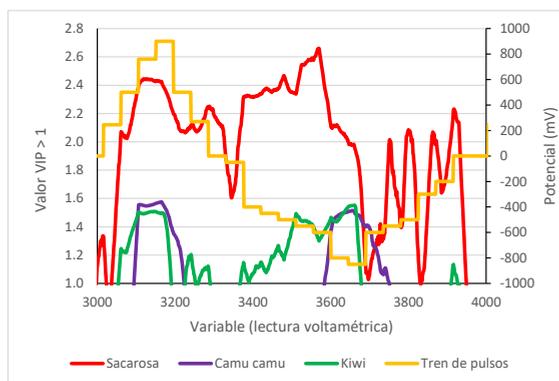


Figura II. 12. Representación del análisis VIP para el sabor dulce y las frutas camu camu y kiwi.

Al igual que en el estudio de los 4 sabores básicos, en el que se realizó un análisis PCA empleando solo la información procedente de los segmentos VIP, en este caso en el que se incorpora la fruta también se realizó. Los resultados mostraron un ligero incremento en la varianza total acumulada, cuando se comparó con el estudio realizado con toda la información. Así se pasó de un valor de 92.17% en 7 componentes principales a un valor del 94,28% empleando 6 componentes. Aunque se produjo una ligera mejora en la varianza total acumulada, se siguió teniendo una influencia muy marcada del pH de forma que la primera componente vino marcada por esta, separando los compuestos ácidos (patrón ácido y las frutas) del resto de sabores. Así al eliminar el patrón ácido y realizar de nuevo el estudio, el resultado obtenido fue similar al mostrado en la Figura II.11., donde al representar PC1 vs PC2 las dos frutas quedan encuadradas en la parte

positiva del PC1 y los sabores en la parte negativa. Pero al representar PC2 vs PC3 el kiwi queda agrupado cerca de la sacarosa (Figura II.13.).

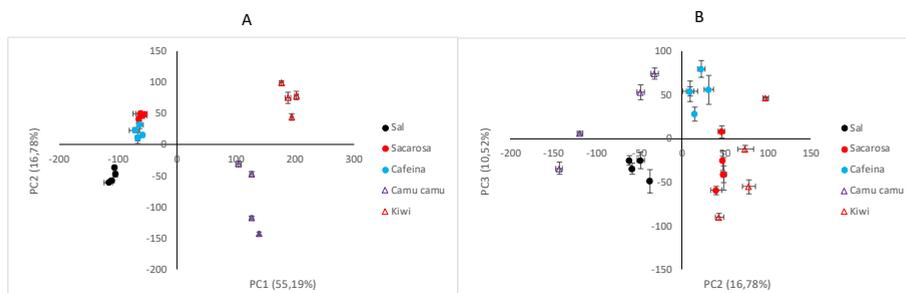


Figura II. 13. Representación gráfica de la componente principal 1 (PC2) frente a la componente principal 2 (PC2) (A) y PC2 frente a PC3 (B) para el estudio de componentes principales (PCA) realizado solo con las lecturas voltamétricas seleccionadas en los segmentos VIP, realizadas sobre los patrones y frutas (exceptuando el patrón ácido).

Evaluación de las características de sabor del café

Tras el estudio de las frutas se procedió a realizar el de las muestras de café siguiendo la misma metodología. El análisis de PCA mostró un 75.02% de varianza total en 3 componentes principales y siendo el PC1 con 44.34% el que permite observar la agrupación de la muestra de café con el sabor ácido. Por otro lado, la PC2, con un peso de 22,61%, también situó el café junto al ácido, pero a la vez junto a la cafeína. Estas mismas agrupaciones de las muestras se observó cuando se utilizaron los segmentos VIP para el estudio de PCA (Figura II.14.), siendo la varianza total obtenida de 78.54% en 3 componentes.

La tendencia a la agrupación del café vendría dado por su carácter ácido, el cual es uno de los atributos a evaluar en un análisis sensorial realizado por paneles de cata especializados en definir las propiedades organolépticas de muestras de café (Salamanca, Fiol, González, Saez, & Villaescusa, 2017). Por otro lado, vendría marcado por la presencia de la cafeína, la cual está presente en el café en una concentración de 0,63 y 1,27 mM.

Si bien el análisis de PCA vino establecido por el empleo de 3 componentes principales, las cuales explican la máxima variabilidad con el menor número de componentes, si tenemos en cuenta la componente 4 observamos como el café se agrupa junto a la sal (Figura II.14.-C). Este resultado podría estar asociado al alto contenido en potasio, magnesio y fósforo (>100 mg/100 g m.s.) y moderado de sodio y calcio (>1 mg/100 g m.s.), que tiene el café (Oliveria et al., 2012; 2015). Al igual que la sal reacciona con el electrodo de plata y cobalto (Figura II.2.), siendo estos electrodos los que muestran las respuestas electroquímicas más marcadas, en el caso del potasio y magnesio, presente en el café, ocurre algo similar. Asumiendo que estos resultados son producto de la interacción con los compuestos anteriormente mencionados, los segmentos VIP de las dos muestras analizadas, se encuentran en los mismos electrodos aunque en diferentes pulsos para la sal y el café (Figura II.15.).

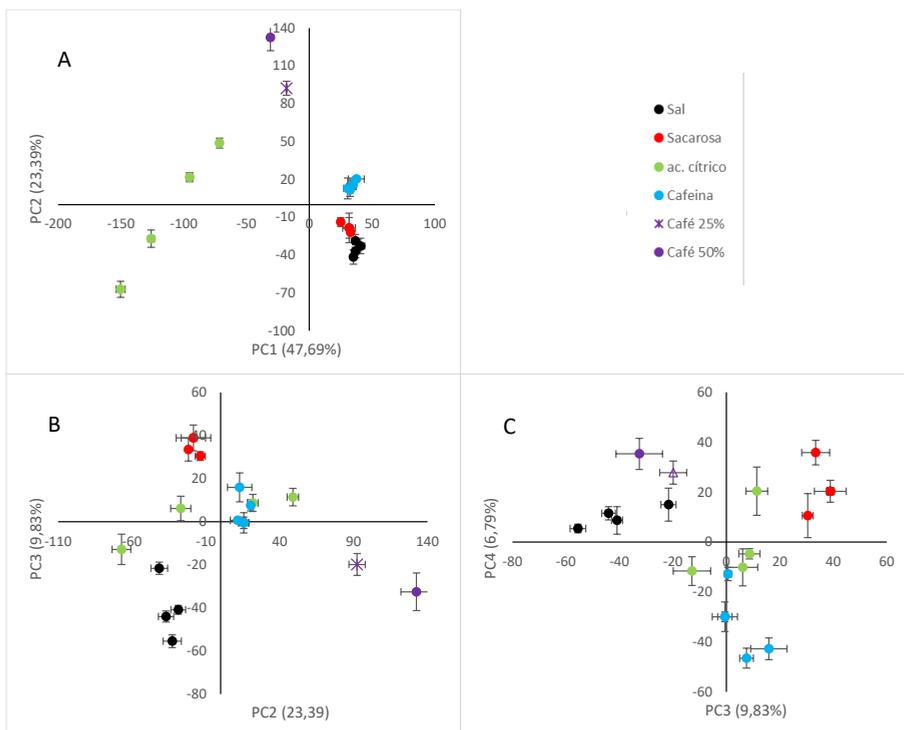


Figura II. 14. Representación gráfica de la componente principal 1 (PC2) frente a la componente principal 2 (PC2) (A), PC2 frente a PC3 (B) y PC3 vs PC4 (C), para el estudio de componentes principales (PCA) realizado solo con las lecturas voltamétricas seleccionadas en los segmentos VIP, realizadas sobre los patrones y muestra de café.

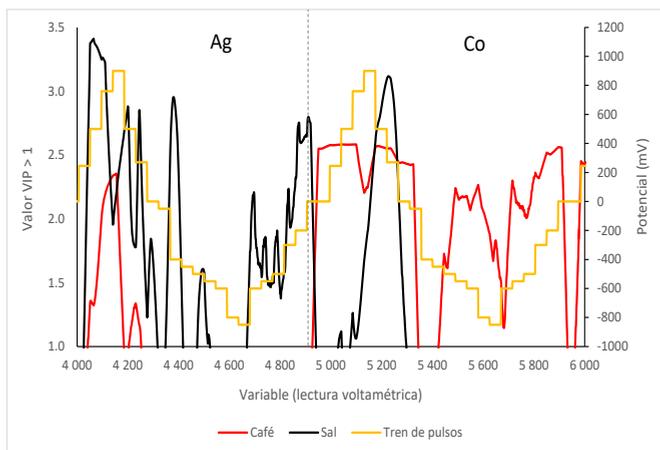


Figura II. 15. Representación del análisis VIP para el sabor salado y el café.

CONCLUSIONES

Mediante la lengua electrónica voltamétrica se ha podido describir los 4 sabores básicos, discriminado para estos las concentraciones testadas cuando el estudio se realiza individualizado.

El estudio de la globalidad de los sabores básicos ha mostrado como la lengua es capaz de discriminar entre sabores e incluso en la mayoría de los casos entre concentraciones. Este resultado ha permitido describir muestras de fruta como camu camu y kiwi, así como de café.

El análisis de muestras ácidas refleja como el equipo es muy sensible al pH por lo que una vez acreditada la acidez de la muestra es necesario eliminar del estudio la componente pH, a fin de proseguir con la descripción de la muestra.

En el caso de las muestras de fruta (camu camu y kiwi), estas son descritas como ácidas que son. Esta descripción fue más intensa para el camu camu, dado su mayor acidez. En el caso del kiwi, en el cual están presentes azúcares, una vez eliminada la componente ácida, también fue descrito como una muestra con un aporte dulce.

El estudio del café muestra como la lengua electrónica voltamétrica es capaz de describirlo inicialmente como ácido y amargo, pero un análisis más profundo lo describe además como una muestra con la presencia de sales.

En todos los casos el análisis de los segmentos VIP ha incrementado la calidad de la descripción, a la vez que ha reducido el volumen de información a procesar.

El estudio ha mostrado como la lengua electrónica voltamétrica podría ser una herramienta en la caracterización sensorial de muestras de alimentos líquidos, si bien no en su totalidad, si para un cribado inicial de las muestras. Pero también es necesario profundizar más en el desarrollo del equipo mediante nuevos estudios los cuales deberían ir dirigidos hacia estudios independientes por grupos o características de alimentos, así como en la búsqueda de los patrones que mejor describan los sabores, pero no como lo realiza el cuerpo humano, sino mediante la reacción electroquímica que lo describa.

REFERENCIAS.

- Alcañiz, M., Vivancos, J.-L., Masot, R., Ibañez, J., Raga, M., Soto, J., & Martínez-Máñez, 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. <http://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.01.014>
- Arbisi, P. A., Levine, A. S., Nerenberg, J., & Wolf, J. (1996). Seasonal alteration in taste detection and recognition threshold in seasonal affective disorder: The proximate source of carbohydrate craving. *Psychiatry Research*, 59(3), 171–182. [http://doi.org/10.1016/0165-1781\(95\)02816-1](http://doi.org/10.1016/0165-1781(95)02816-1)
- Ben Aoun, S., Bang, G. S., Koga, T., Nonaka, Y., Sotomura, T., & Taniguchi, I. (2003). Electrocatalytic oxidation of sugars on silver-UPD single crystal gold electrodes in alkaline solutions. *Electrochemistry Communications*, 5(4), 317–320. [http://doi.org/10.1016/S1388-2481\(03\)00055-9](http://doi.org/10.1016/S1388-2481(03)00055-9)
- Buratti, S., Scampicchio, M., Giovanelli, G., & Mannino, S. (2008). A low-cost and low-tech electrochemical flow system for the evaluation of total phenolic content and antioxidant power of tea infusions. *Talanta*, 75(1), 312–316. <http://doi.org/10.1016/j.talanta.2007.11.014>
- Burke, L. D., & Nugent, P. F. (1998). The electrochemistry of gold: II the electrocatalytic behaviour of the metal in aqueous media. *Gold Bulletin*, 31(2), 39–50. <http://doi.org/10.1007/BF03214760>
- Chirinos, R., Galarza, J., Betalleluz-Pallardel, I., Pedreschi, R., & Campos, D. (2010). Antioxidant compounds and antioxidant capacity of Peruvian camu camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh) fruit at different maturity stages. *Food Chemistry*, 120(4), 1019–1024. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.11.041>
- Deisingh, A. K., Stone, D. C., & Thompson, M. (2004). Applications of electronic noses and tongues in food analysis. *International Journal of*

- Food Science and Technology, 39(6), 587–604. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2004.00821.x>
- Hassan, H. H., Ibrahim, M. A. M., Rehim, S. S. A. El, & Amin, M. A. (2010). Comparative studies of the electrochemical behavior of silver electrode in chloride, bromide and iodide aqueous solutions. *International Journal of Electrochemical Science*, 5(2), 278–294.
- Hladik, C. M., & Simmen, B. (1996). Taste perception and feeding behavior in nonhuman primates and human populations. *Evol. Anthrop.*, 5(2), 57–72.
- Ivarsson, P., Holmin, S., Höjer, N. E., Krantz-Rülcker, C., & Winquist, F. (2001). Discrimination of tea by means of a voltammetric electronic tongue and different applied waveforms. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 76(1–3), 449–454. [http://doi.org/10.1016/S0925-4005\(01\)00583-4](http://doi.org/10.1016/S0925-4005(01)00583-4)
- Kinnamon, S. C. (2013). *NIH Public Access*, 204(2), 158–168. <http://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2011.02308.x>.Taste
- Kiyoshi, T. (1998). A taste sensor. *Measurement Science and Technology*, 9(12), 1919. <http://doi.org/10.1088/0957-0233/9/12/001>
- Kobayashi, Y., Habara, M., Ikezaki, H., Chen, R., Naito, Y., & Toko, K. (2010). Advanced taste sensors based on artificial lipids with global selectivity to basic taste qualities and high correlation to sensory scores. *Sensors*, 10(4), 3411–3443. <http://doi.org/10.3390/s100403411>
- Leontowicz, H., Leontowicz, M., Latocha, P., Jesion, I., Park, Y. S., Katrich, E., Gorinstein, S. (2016). Bioactivity and nutritional properties of hardy kiwi fruit *Actinidia arguta* in comparison with *Actinidia deliciosa* “Hayward” and *Actinidia eriantha* “Bidan.” *Food Chemistry*, 196, 281–291. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.08.127>
- Mathematics, A. (2014). *ijpam.eu*, 94(3), 307–322.

- Mojet, J., Christ-Hazelhof, E., & Heidema, J. (2001). Taste perception with age: generic or specific losses in threshold sensitivity to the five basic tastes? *Chemical Senses*, 26(7), 845–860. <http://doi.org/10.1093/chemse/28.5.397>
- Obrebowski, A., Obrebowska-Karsznia, Z., & Gawliński, M. (2000). Smell and taste in children with simple obesity. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*, 55(3), 191–196. [http://doi.org/10.1016/S0165-5876\(00\)00397-9](http://doi.org/10.1016/S0165-5876(00)00397-9)
- Palermo, G., Piraino, P., & Zucht, H. D. (2009). Performance of PLS regression coefficients in selecting variables for each response of a multivariate PLS for omics-type data. *Advances and Applications in Bioinformatics and Chemistry*, 2(1), 57–70. <http://doi.org/10.2147/AABC.S3619>
- Salamanca, C. A., Fiol, N., González, C., Saez, M., & Villaescusa, I. (2017). Extraction of espresso coffee by using gradient of temperature. Effect on physicochemical and sensorial characteristics of espresso. *Food Chemistry*, 214, 622–630. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.07.120>
- Scampicchio, M., Ballabio, D., Arecchi, A., Cosio, S. M., & Mannino, S. (2008). Amperometric electronic tongue for food analysis. *Microchimica Acta*, 163(1–2), 11–21. <http://doi.org/10.1007/s00604-008-0915-8>
- Wyszynski, B., & Nakamoto, T. (2015). Chemical sensors. *Flavour Development, Analysis and Perception in Food and Beverages*, 83–104. <http://doi.org/10.1016/B978-1-78242-103-0.00005-9>

CAPÍTULO III

***APLICACIÓN DEL EQUIPO DE LEV COMO
HERRAMIENTA EN LA PRE CARACTERIZACIÓN DE
CAFÉ***

RESUMEN

El objetivo planteado en el presente estudio es la evaluación de la lengua electrónica voltamétrica (LEV) como herramienta para una primera caracterización de cafés. Para ello se han utilizado seis muestras de café provenientes de Colombia, 4 provistas por una exportadora de café y resultado de la mezcla de diferentes proporciones de cafés de la especie arábica de la clasificación Supremo y UGQ, y dos muestras también de la especie arábica pero de la variedad Caturra (proporcionadas por CESURCAFE). Las muestras fueron analizadas en origen por un panel sensorial conformado por expertos y posteriormente los resultados se compararon con los obtenidos por análisis fisicoquímicos y voltamétricos (empleando una lengua electrónica voltamétrica equipada con seis electrodos; Ir, Rh, Pt, Au, Ag, Cu, Co, Ni). Los resultados han mostrado como LEV puede evaluar la característica de pH y capacidad antioxidantes de los cafés. Además, en base a estos también podría reflejar la posible capacidad de LEV para caracterizar la puntuación global de los análisis sensoriales, si bien nuevos estudios son necesarios para una mejor evaluación de LEV como herramienta de descripción de cafés, los cuales se tendrían que hacer con cafés que presenten diferencias sensoriales que permitan ser modelizadas en su caso.

INTRODUCCIÓN

El café es una de las bebidas más populares y consumidas en el mundo debido a sus características organolépticas y efectos estimulantes (Alves, Casal, & Oliveira, 2010; Chalfoun et al., 2013; Di Bella, Potorti, Lo Turco, Saitta, & Dugo, 2014; Esquivel & Jiménez, 2012). Gracias a estas propiedades a partir de los años 90 se ha venido utilizando el término “café especial” y “café gourmet” como referente de calidad, entendiéndose como café especial aquel que presenta un sabor excelente y único (Piccino, Boulanger, Descroix, & Sing, 2014). En la actualidad el café es cultivado en más de 70 países de los cuatro continentes, siendo Brasil el mayor productor, seguido por Vietnam y Colombia (Bicho, Lidon, Ramalho, & Leitão, 2013; Di Bella et al., 2014).

El café pertenece al género *Coffea* de la familia *Rubiaceae* con más de 70 especies, de las cuales tres son las utilizadas en la preparación de la bebida; *C. arábica* (café arábica), *C. canephora* (café robusta) y *C. liberica* (café liberiano o Libérica, o café excelsa), siendo los cafés de la especie arábica los preferidos por los consumidores además de que se los que se considera de mejor calidad y valor en los mercados internacionales (Naranjo, Vélez, & Rojano, 2011; Josiane Alessandra Vignoli, Viegas, Bassoli, & Benassi, 2014). En ese sentido la Organización Internacional del Café (OIC) declaró que para el 2012, alrededor de 1,4 mil millones de tazas de café son consumidas todos los días, principalmente en América del Norte y en Europa convirtiéndose en una bebida esencial de la vida diaria.

El proceso de obtención de la bebida es un proceso que consta de varias etapas en la que una vez cosechado el grano es despulpado pasando por un

proceso de fermentación el cual tiene una duración de 12 horas máximo 30, dependiendo de las condiciones de altitud y clima. Una vez terminada la fermentación se realiza el lavado para su posterior paso al secado que puede ser solar (natural) o mecánico, siendo el primero el más utilizado en Colombia. Finalmente el café es comercializado, con un porcentaje de humedad del 10-12% (Kuit, Jasen, & Van Thiet, 2004), a las trilladoras en donde la materia prima se somete a un proceso de trilla el cual se realiza la limpieza, trillado y clasificado del café. Esta clasificación se hace por tamaño (Excelso UGQ, Excelso Caracol, Excelso Premium, Excelso Supremo, Excelso Extra y Excelso Maragogipe), densidad y color, obteniéndose el café excelso (verde) el cual es empacado en sacos de 60 kg para su posterior exportación. Pero, para que las trilladoras puedan exportar el café estas deben cumplir con los requisitos exigidos por la Federación Nacional de Cafeteros (FNC) mediante la resolución 2 del 25 de abril de 2016. De este modo el café llega al mercado europeo y estadounidense, en donde se encargan de transformar el producto sometiéndolo a un proceso de tostado a temperaturas de entre 200 y 250°C, según el grado de tostado (claro, medio u oscuro). Esto provoca cambios fisicoquímicos significativos que implican la degradación térmica de antioxidantes fenólicos naturales, la generación de sabores y compuestos de color marrón (melanoidinas) producto de la reacción de Maillard (Liu & Kitts, 2011; Wang, 2012).

El tostado es quizás el parámetro más importante en el resultado en la elaboración del café (Santos et al., 2016; Wei et al., 2012) del cual dependerá el desarrollo de componentes volátiles, como el aroma atributo característico del café que se forma durante este proceso, y que se compone de una mezcla compleja de compuestos volátiles en la que se destacan los

principales compuestos en el café tostado como el azufre, triazinas, pirroles, fenoles, furanos entre otros. Por otro lado, los granos de café tostado se componen de carbohidratos, fragmentos de proteínas, ácidos de bajo peso molecular, cafeína, trigonelina, lípidos, muchas moléculas desconocidas generalmente llamados melanoidinas, y más de 900 compuestos volátiles formados principalmente durante el proceso de tostado (Oestreich-Janzen, 2010). Aunque las composiciones varían para los granos de café de diferentes especies, orígenes, grados de tostado, o métodos analíticos, se observa con frecuencia la degradación de los polisacáridos, oligosacáridos (especialmente sacarosa), ácidos clorogénicos y trigonelina. Se puede considerar que la formación del aroma característico, sabor y color de resulta primero de la disminución drástica de los componentes del café verde, como sacarosa, aminoácidos libres, ácidos clorogénicos, y trigonelina, así como de la descomposición de polisacáridos y proteínas. Parámetros como el sabor y aroma, son tomados en cuenta, principalmente debido a su estrecha relación con la satisfacción del consumidor (Chemining, 2015). Su determinación se realiza por medio del análisis sensorial, fundamental cuando se trata de caracterizar la calidad de una muestra de café (Bertrand et al., 2012), evaluándose por parte de paneles de cata conformados por expertos, parámetros como densidad, sabor, sabor residual, acidez, cuerpo, dulzor, taza limpia y de las muestras (Jokanovic, Dzinic, Cvetkovic, Grujic, & Odzakovic, 2012, SCAA 2017).

Debido a la transformación que el grano sufre es importante garantizar la calidad de este sensorialmente en el país de origen, además de los aspectos mencionados anteriormente. En ese sentido muchos países productores han adoptado la metodología de la asociación americana de cafés especiales

(SCAA por sus siglas en ingles), la cual es la encargada de discutir temas y establecer normas de calidad para el comercio de café de especialidad, como también la de formar y certificar a los catadores expertos encargados de realizar esta evaluación. Los cafés especiales implican una serie de componentes y sistemas de producción destinadas a producir café de alta calidad para los mercados internacionales, el cual crea nuevas formas de consumo centrado en la calidad, diferenciación y características del café (Sepúlveda, Chekmam, Maza, & Mancilla, 2016). Un catador puede llegar a evaluar más de 40 muestras por día en una exportadora, de acuerdo a la producción que en Colombia es de dos periodos de cosecha, lo que supone una producción durante todo el año. En ese sentido la exposición de catadores a grandes jornadas de trabajo conlleva al cansancio, estado anímico bajo, estrés, entre otros; factores que llevan a una valoración subjetiva o errónea de los cafés (Rodríguez, Durán, & Reyes, 2010). Es por ello que el uso de herramientas que puedan reducir el volumen de muestras a analizar sería una mejora para el sector. Así la existencia de herramientas tecnológicas como la nariz electrónica (NE) y lengua electrónica voltamétrica (LEV) pueden ser de gran ayuda evitando saturación de los sentidos, permitiendo realizar medidas objetivas e incluso aumentar el número de muestras analizadas.

La nariz electrónica, cuya función es detectar compuestos volátiles y caracterizarlos basados en la interacción entre sensores y las respuestas obtenidas (Rodríguez et al., 2010) se ha utilizado para diferenciar entre muestras de café (Dong, Zhao, Hu, Dong, & Tan, 2017; Buratti et al., 2015; Severini et al., 2015), de igual forma que se ha estudiado la aplicación de las lenguas voltamétricas electrónicas en la caracterización de cafés (Dong et al.,

2017; Lopetcharat et al. 2016; Buratti et al., 2015; Várvolgyi et al., 2014), en donde la muestra del extracto de café entra en contacto directo con los sensores para por medio de procesos electroquímicos proveer de señales características de cada compuesto. Todos estos estudios han sido una aproximación en la caracterización de los cafés, es por lo que en el presente estudio se plantea el objetivo de evaluar la lengua electrónica voltamétrica como herramienta para una primera caracterización de cafés.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Muestras.

Para la consecución de este estudio se utilizaron seis muestras de café. De los cuales cuatro (códigos 1, 2, 5 y 6) fueron de la especie arábica, proporcionados por una trilladora exportadora de café, los cuales son producto de mezclas en diferentes proporciones de cafés de la clasificación UGQ (Usual Good Quality) y Supremo. Los 2 restantes (códigos 3 y 4) fueron suministrados por el Centro Surcolombiano de Investigación en Café “Cesurcafe” de la Universidad Surcolombiana. Estos fueron de la misma especie, arábica, y de variedad caturra, si bien cada uno de ellos de diferente origen. Todos ellos fueron tostados individualmente en una tostadora de café en el laboratorio de la Universidad Sur de Colombia, a una temperatura de 160°C durante 7 minutos. Tras el tostado, parte de cada una de las muestras fue analizada sensorialmente de acuerdo al protocolo de Asociación Americana de Cafés Especiales “SCAA” (2015). El resto fueron envasadas en grano y enviadas a la Universidad Politécnica de Valencia

“UPV” donde fueron almacenadas a temperatura ambiente hasta el inicio de los análisis.

Preparación de las muestras.

Todos los análisis, a excepción del color que se realizó sobre el café molido, fueron realizados sobre el café en infusión, para lo que se tuvo que preparar esta. A tal fin, primero el café tuvo que ser molido. Para ello se colocaron 20 gramos de café en grano en un molino y se molió durante 50 segundos hasta obtener un tamaño de partícula el cual se pudiese definir como “café expreso”. Para evaluar el tamaño de partícula se utilizó un Laser Scattering (Mastersizer 2000, Malvern, Instruments, UK), equipado con una unidad Scirocco (Dry Powder Unit) (Villarino et al., 2015) y con un rango de medida de 0.02-2000 μm . Como resultado se mostró que un 90% de la distribución promedio se encontraba por debajo de 639 μm , valor que puede considerarse “café expreso” (Kocadağlı & Gökmen, 2016).

Para la obtención del extracto (infusión), 12 gramos del café previamente molido se colocaron en el filtro de una cafetera italiana, junto con 150 mL de agua, la cual se situó sobre una fuente de calor a temperatura constante durante 12 minutos. El extracto obtenido se almacenó en recipientes cerrados y aislados de la luz, para ser analizados durante el mismo día de su extracción.

Métodos

Análisis sensorial

Las muestras fueron analizadas por un panel de cata conformado por expertos, por medio del protocolo de la asociación americana de cafés especiales (SCAA, 2015), y se llevó a cabo en la Universidad Sur de Colombia. Los datos mostrados han sido facilitados por los colaboradores en la Universidad.

Determinación del color

La evaluación del color se realizó sobre las muestras de café recién molido. Para ello se utilizó un colorímetro Konica minolta CM-700d (Konica Minolta Sensing INC., Osaka, Japan) conformado por un iluminante D₆₅ y un observador estándar 10° (UNE 40-080, 1984), con una apertura de diafragma de 8mm de diámetro. Las muestras se colocaron sobre un disco, enrasándose y prensándose mediante una pesa de 2kg, para posteriormente ser medida. La determinación y expresión del color se efectuó en base a las coordenadas CIEL*a*b* y a los valores de reflectancia (CIE, 1976). Los valores de Cromo (C*) y tono de color (h) (Weatherall & Coombs, 1992).

Determinación de pH

El pH de los extractos de café se evaluó de forma directa por medio de un potenciómetro pH – meter BASIC 20+ fabricado por Crison.

Determinación de fenoles totales (FT).

Se utilizó el método de Folin-Ciocalteu de acuerdo al método descrito por Bravo, Monente, Juárez, De Peña, & Cid, 2013 y Ludwig et al., 2012. Se preparó una disolución 1:10 de cada muestra con agua destilada, se adicionaron 500 µL del reactivo Folin-Ciocalteu a la mezcla de 100 µL de

muestra con 7,9 mL de agua destilada. Después se agregaron 1,5 mL de carbonato de sodio al 7,5%. Las muestras se incubaron en un lugar oscuro a temperatura ambiente por 90 minutos. La absorbancia de las muestras fue medida a 765 nm en un espectrofotómetro Helios Zeta UV-VIS. Los análisis para cada muestra se realizaron por triplicado. Para la curva de calibración se utilizó el ácido gálico (AG) como referencia.

Determinación de sólidos solubles. Índice de refracción (IR).

Los sólidos en suspensión presentes en los extractos de las muestras de café se evaluaron por medio de un refractómetro de mesa (RFM 330+ Automatic Digital Refractometer), calibrado a 20°C.

Determinación de la capacidad antioxidante

La determinación de la capacidad antioxidante, tanto del trolox, patrón utilizado como referencia en la determinación de la capacidad antioxidante y utilizada para la obtención del modelo, como de los extractos de café, se realizó mediante el método ABTS (Kuskoski, Asuero, Troncoso, Mancini-Filho, & Fett, 2005; Re et al., 1999), modificado durante la realización del trabajo con la finalidad de ajustarlo a la base utilizada. El método se fundamenta en la cuantificación espectrofotométrica de la reducción de un radical estable preformado (ABTS•+).

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

En primer lugar, se preparó la solución madre de trabajo de color azul-verde intenso. Para ello se mezclaron dos reactivos a partes iguales (ABTS+ y per sulfato de potasio). La solución se dejó reaccionar 12 horas en oscuridad a temperatura ambiente. Una vez transcurrido este tiempo, se diluyó el radical en la base y se ajustó hasta que su lectura a 734 nm fuese de $1,1 \pm 0,02$.

En segundo lugar, se procedió a obtener la recta de calibrado (concentración trolox vs capacidad antioxidante). Para ello se prepararon disoluciones de trolox (0,1; 0,25; 0,5; 1,25; 2,5 y 5 mM) sobre una base de fosfato de potasio y di hidrógeno fosfato de sodio 0,01 M y a pH 7,4.

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

En el caso de las muestras de café, estas fueron diluidas con la base hasta que la concentración fuera tal que pudiese ser evaluada mediante la recta obtenida con la solución trolox, siguiendo el protocolo anterior.

Análisis Voltamétrico por medio de LEV. Caracterización de las respuestas voltamétricas obtenidas

Para el estudio se empleó una lengua electrónica diseñada y desarrollada por el Instituto de reconocimiento molecular y desarrollo tecnológico de la UPV. La configuración de pulsos utilizadas fue una secuencia de pulsos “genérica” pues se utilizó en los apartados previos (0, 200, 500, 800, 900, 500, 300, 0, -

50, -400, -450, -500, -600, -650, -800, -850, -650, -600, -550, -400, -200, 0 mV) es decir 22 pulsos entre -800mV y 900mV con una duración de pulso de 20ms para los electrodos de Ir, Rh, Pt, Au, Ag, Co, Cu y Ni. Luego de cada medición se procedió a limpiar los electrodos por abrasión, puliendo las superficies de los electrodos con la finalidad de eliminar cualquier tipo de sustancia generada a lo largo del proceso de medición.

Para el estudio, las infusiones fueron diluidas al 50% en una solución electrolítica ajustada a pH 4.8.

Análisis estadístico.

El análisis estadístico se realizó a partir de los datos obtenidos en los análisis realizados por triplicado sobre dos réplicas de extracción de cada uno de los cafés. El estudio de los resultados obtenidos en los análisis fisicoquímicos y sensoriales se llevó a cabo mediante el análisis de varianza (ANOVA simple) por medio del software Statgraphics Centurion XVI. I. En aquellos casos en los que se observaron diferencias, éstas fueron evaluadas mediante el test LSD, con un nivel de confianza del 95%. Además, con la finalidad de evaluar las muestras teniendo en cuenta la totalidad de los resultados fisicoquímicos o sensoriales, se realizó un análisis de componentes principales (PCA) para cada grupo de datos. El número de componentes principales seleccionados se basó en los cambios de tendencia del gráfico de codo que relaciona la cantidad de varianza acumulada con el número de componentes.

La evaluación de la relación de las respuestas voltamétricas entre las diferentes muestras, es decir, la evaluación de señales iguales o diferentes entre cafés se realizó mediante un análisis de componentes principales. Por otro lado, la caracterización de la respuesta voltamétrica se realizó a través

de dos estudios. En un primero basado en la caracterización con los cuatro sabores básicos, tal y como se desarrolló en el capítulo 2. En un segundo, en la caracterización mediante un análisis de correlación multifactorial PLS “Partial least squares regression” entre los valores voltamétricos y cada una de las variables del análisis sensorial y fisicoquímico determinadas.

El análisis de PLS se desarrolló mediante la modelización de las variables (lecturas voltamétricas) de forma que expresasen los valores de las variables respuesta (valores fisicoquímicos o sensoriales). Los resultados se evaluaron a partir de los coeficientes de calibración (Cal) y cros validación (CV) siguiendo el procedimiento sugerido por (Ropodi, Panagou, & Nychas, 2016), cuando el número de muestras es inferior a 40. La eficacia del estudio se evaluó en función de los valores del coeficiente de regresión (R^2), Bias y suma de error cuadráticos (RMSE).

Estos análisis estadísticos se realizaron por medio de la herramienta PLS Toolbox 6.3 (Eigenvector Research Inc., Wenatchee, Washington, USA), una extensión en el ambiente computacional R2012a (The Mathworks, Natick, Massachusetts, USA).

RESULTADOS.

Análisis sensorial

Los resultados obtenidos a partir del análisis sensorial por medio de un panel de cata conformado por expertos según los parámetros evaluados por la SCAA se recogen en la Tabla III.1. Entre los parámetros sujetos de análisis se

encuentran: fragancia/aroma (F/A), sabor (S), sabor residual (SR) y dulzor (D), los cuales no presentaron diferencias significativas para los diferentes extractos de café posiblemente porque todas las muestras pertenecían a la variedad de café Arábica. Por otro lado, los parámetros de acidez (A), cuerpo (C), uniformidad (U), balance (B), taza limpia (TL) y puntaje del catador (PC), sí que mostraron diferencias significativas, especialmente la muestra de café 4 debido a sus bajas puntuaciones, siendo este el café peor valorado por el panel de Cata. La figura III.1. representa la relación entre las muestras y las variables del análisis sensorial por medio del gráfico biplot del análisis de PCA. Todos los cafés fueron agrupados espontáneamente en un único grupo a excepción del café 4 que se localizó en el cuadrante inferior derecho del plano, y que por lo tanto discriminado como diferente por los mayores valores de F/A, SR y menor de C y R.

Tabla III. 1. Resultados de los atributos de las muestras de café evaluados sensorialmente por un panel de cata conformado por expertos. Fragancia/aroma (F/A), sabor (S), sabor residual (SR), acidez (A), cuerpo (C), uniformidad (U), balance (B), taza limpia (TL), dulzor (D) y puntaje del catador (PC).

Atributo	Café 1	Café 2	Café 3	Café 4	Café 5	Café 6
F/A	7,63 ± 0,48 ^a	7,81 ± 0,55 ^a	8,13 ± 0,60 ^a	8,38 ± 0,48 ^a	7,81 ± 0,55 ^a	7,69 ± 0,38 ^a
S	7,13 ± 0,63 ^a	7,56 ± 0,52 ^a	7,69 ± 0,38 ^a	7,50 ± 0,20 ^a	7,56 ± 0,52 ^a	7,25 ± 0,29 ^a
SR	7,13 ± 0,75 ^a	7,31 ± 0,69 ^a	7,69 ± 0,69 ^a	7,8 ± 0,14 ^a	7,44 ± 0,43 ^a	7,25 ± 0,50 ^a
A	7,06 ± 0,31 ^{ab}	7,25 ± 0,20 ^{bc}	7,69 ± 0,38 ^c	6,56 ± 0,43 ^a	7,25 ± 0,29 ^{bc}	7,38 ± 0,48 ^{bc}
C	6,88 ± 0,25 ^b	7,06 ± 0,13 ^{bc}	7,38 ± 0,25 ^c	6,38 ± 0,43 ^a	7,06 ± 0,13 ^{bc}	6,88 ± 0,25 ^b
U	10,00 ± 0,00 ^b	10,00 ± 0,00 ^b	10,00 ± 0,00 ^b	8,00 ± 0,00 ^a	10,00 ± 0,00 ^b	10,00 ± 0,00 ^b
B	10,00 ± 0,00 ^b	10,00 ± 0,00 ^b	10,00 ± 0,00 ^b	8,00 ± 0,00 ^a	10,00 ± 0,00 ^b	10,00 ± 0,00 ^b
TL	9,75 ± 0,50 ^b	10,00 ± 0,00 ^b	10,00 ± 0,00 ^b	8,00 ± 0,00 ^a	10,00 ± 0,00 ^b	10,00 ± 0,00 ^b
D	10,00 ± 0,00 ^a	10,00 ± 0,00 ^a	10,00 ± 0,00 ^a	9,50 ± 1,00 ^a	10,00 ± 0,00 ^a	10,00 ± 0,00 ^a
PC	6,25 ± 0,29 ^a	6,19 ± 0,38 ^a	7,06 ± 0,31 ^b	6,13 ± 0,14 ^a	6,50 ± 0,58 ^a	6,31 ± 0,38 ^a
Total	81,81 ± 1,43 ^b	83,19 ± 1,39 ^b	85,62 ± 1,16 ^c	75,81 ± 0,99 ^a	83,63 ± 1,30 ^b	82,75 ± 1,50 ^b

* Todos los valores son mostrados como medias \pm desviación estándar
Diferente letra en la misma fila expresa diferencias estadísticas p-value<0.05.

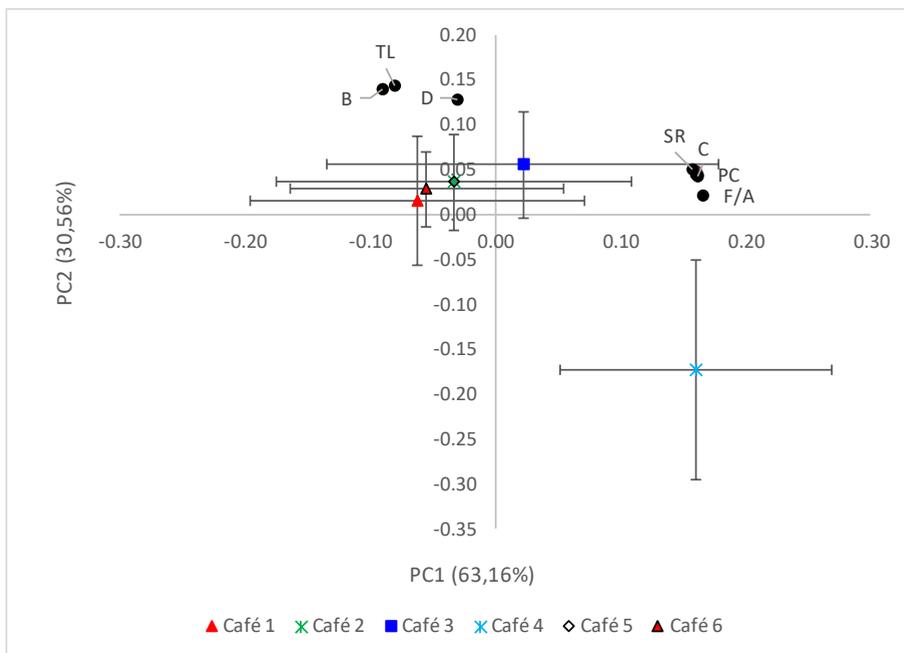


Figura III. 1. Biplot parámetros organolépticos.

Análisis fisicoquímicos

Los valores promedio, desviación estándar y análisis estadísticos de los resultados obtenidos mediante los análisis fisicoquímicos de color (L^* , a^* , b^* , C y h), fenoles totales (FT), pH, índice de refracción (IR), densidad (D) y capacidad antioxidante (CA) se recogen en la Tabla III.2.

Los parámetros de color mostraron diferencias estadísticamente significativas entre las muestras. Para el parámetro luminosidad (L^*), el café 1 fue similar a 2 y 5 (valores en torno a 16), pero estos dos últimos diferentes entre sí. Por otro lado, los cafés 3, 4 y 6 tuvieron valores similares con valores L^* cercanos a 13. Según la clasificación de (Ludwig, Bravo, De Peña, & Cid, 2013), los valores de L^* se pueden clasificar en oscuros ($L^* < 23$), medios ($L^* 23-26$) y claros ($L^* > 26$), por lo que las muestras de café analizadas se las considera oscuras. Los parámetros a^* y b^* mostraron valores mayores a los de L^* . Esta relación difiere de lo observado por otros autores (Contreras-Calderón et al., 2016) en donde observó que a^* y b^* presentan valores inferiores a L^* . Según Summa, de la Calle, Brohee, Stadler, & Anklam, 2007, cuanto mayor sea el nivel de tostado menores serán estos valores, si bien estas medidas son medidas independientes según el tipo de procesado. Para el parámetro C^* , relacionado con el grado de tostado de café y por consiguiente con la pureza de color de las muestras, se conservan similitudes de acuerdo al proveedor, no existiendo diferencias entre los cafés procedentes de Cesurcafe (cafés 3 y 4) ni entre los procedentes de la exportadora, a excepción del café 2 que si presentó diferencias.

El contenido de fenoles totales se mostró significativamente diferente para cada una de las muestras. La muestra de café 1 presentó los valores más altos ($53,89 \pm 3,14$ mg AG/g), mientras que la muestra de café 6 fue la que presentó menores valores ($44,21 \pm 1,54$ mg AG/g). Todos los valores obtenidos fueron superiores a los reportados por Caporaso, Genovese, Canela, Civitella, & Sacchi, 2014., de 29,74 mg AG/g para el mismo tipo de preparación de las muestras. Además, en este mismo estudio se reportaron valores de pH de 5.71, si bien en otros estudios lo valores fueron de 4.69 a

5.20 (Maris et al., 2005), o de 4.96 a 5.98 en café variedad arábica procedente del occidente de honduras (Díaz Noguera & Perdomo Reyes, 2015), todos ellos superiores a los obtenidos en el presente estudio (4.68 - 4.94), lo cuales si bien fueron estadísticamente iguales para las muestras de la variedad Caturra (café 3 y 4), sí que presentaron diferencias con las muestras obtenidas a partir de la mezcla de los cafés UCG y supremo.

Los valores de Índice de refracción y densidad fueron similares a los observados por Parenti et al., 2014, quien comparó diferentes métodos de preparación de café expreso. Para el índice de refracción, solo la muestra de café 1 mostró diferencias estadísticas con todas las demás muestras. En cambio los valores de densidad sí mostraron mayor variación entre muestras, con valores que van desde 1,012 hasta 1,34 g/mL, existiendo diferencias estadísticamente significativas entre las muestras de café 3 con los cafés 4 y 5, los cuales no mostraron diferencias entre sí.

El estudio de la capacidad antioxidante expresada como equivalentes trolox mostró diferencias estadísticas entre todos los cafés. El café que menores valores obtuvo fue el café 1 ($32,69 \pm 0,37$ eq. Trolox (mM)) y el mayor el café 2 ($48,94 \pm 0,18$). Si bien el café es conocido por su alto contenido de sustancias antioxidantes como son los ácidos clorogénicos y los ácidos hidroxinámicos, durante el proceso de tostado, la cantidad de polifenoles se reduce desde un 12% hasta un 2%, aunque se ha demostrado que los compuestos que confieren las propiedades antioxidantes al café son aquellos que se producen precisamente como resultado del proceso de tostado como las melanoidinas y algunos compuestos producto de la reacción de Maillard. Además la cafeína y los compuestos volátiles también

contribuyen en la capacidad antioxidante total, si bien se desconoce la su actividad antioxidante en la matriz del café (Cämmerer & Kroh, 2006; Karamać, Buciński, Pegg, & Amarowicz, 2005; Pérez-Martínez, Caemmerer, De Peña, Concepción, & Kroh, 2010)

Tabla III. 2. Resultados análisis fisicoquímicos realizados a las muestras. Parámetros de color (L^* , a^* , b^* , C y h), fenoles totales (FT) (mg ácido gálico / g de café molido), pH, índice de refracción (IR), densidad (D) (g/mL) y capacidad antioxidante (CA) (Eq. Trolox (mM)).

	Café 1	Café 2	Café 3	Café 4	Café 5	Café 6
L^*	15,73 ± 0,67 ^{bc}	17,22 ± 0,96 ^c	13,51 ± 1,02 ^a	12,61 ± 1,34 ^a	15,61 ± 0,31 ^b	13,91 ± 0,30 ^a
a^*	23,96 ± 0,87 ^b	23,00 ± 0,12 ^a	25,73 ± 0,45 ^c	25,53 ± 0,57 ^c	23,83 ± 0,19 ^{ab}	25,74 ± 0,30 ^c
b^*	27,06 ± 1,12 ^{bc}	29,37 ± 1,26 ^c	23,27 ± 1,74 ^a	21,73 ± 2,29 ^a	26,85 ± 0,54 ^b	23,97 ± 0,53 ^a
C^*	36,18 ± 0,33 ^{cd}	37,35 ± 0,98 ^d	34,75 ± 0,86 ^{ab}	33,60 ± 1,07 ^a	35,92 ± 0,41 ^{bc}	35,20 ± 0,17 ^{bc}
h^*	48,45 ± 2,18 ^b	51,90 ± 1,34 ^b	42,03 ± 2,62 ^a	40,29 ± 3,58 ^a	48,38 ± 0,66 ^b	42,94 ± 0,95 ^a
FT	53,89 ± 3,14 ^b	51,57 ± 3,26 ^c	47,39 ± 1,78 ^{ab}	47,93 ± 1,75 ^{ab}	48,93 ± 1,89 ^{bc}	44,21 ± 1,54 ^a
pH	4,94 ± 0,01 ^d	4,77 ± 0,03 ^b	4,79 ± 0,05 ^b	4,78 ± 0,02 ^b	4,68 ± 0,02 ^a	4,85 ± 0,02 ^c
IR	1,3379 ± 0,0004 ^a	1,3374 ± 0,0001 ^b	1,3372 ± 0,0001 ^b	1,3373 ± 0,0001 ^b	1,3374 ± 0,0001 ^b	1,3373 ± 0,0001 ^b
D	1,012 ± 0,001 ^{ab}	1,012 ± 0,001 ^{ab}	1,011 ± 0,000 ^a	1,014 ± 0,001 ^b	1,014 ± 0,002 ^b	1,012 ± 0,000 ^{ab}
CA	32,69 ± 0,37 ^a	48,94 ± 0,18 ^b	41,66 ± 0,14 ^c	46,25 ± 0,19 ^d	43,82 ± 0,22 ^e	42,56 ± 0,19 ^f

* Todos los valores son mostrados como medias ± desviación estándar
Diferente letra en la misma fila expresa diferencias estadísticas p-value<0.05.

Con la finalidad de evaluar los cafés teniendo en cuenta la totalidad de las variables fisicoquímicas analizadas se realizó un análisis de componentes principales PCA. En la Figura III.2. se muestran los resultados del biplot. En base a los resultados, los dos cafés de la variedad caturra (cafés 3 y 4) y el café 6 presentarían características similares, muy marcadas positivamente por los valores de a^* y negativamente por los de FT y L^* . En cambio, los cafés 2 y 5, si bien serían clasificados entre ellos como diferentes, se situaron en un cuadrante diferente a los anteriores, sobre todo por la influencia del parámetro luminosidad. Finalmente, el café 1 sería el que mayores

diferencias presentaría sobre el resto, las cuales vendrán marcadas fundamentalmente por una gran influencia positiva del índice de refracción (IR) y negativa de la capacidad antioxidante (CA).

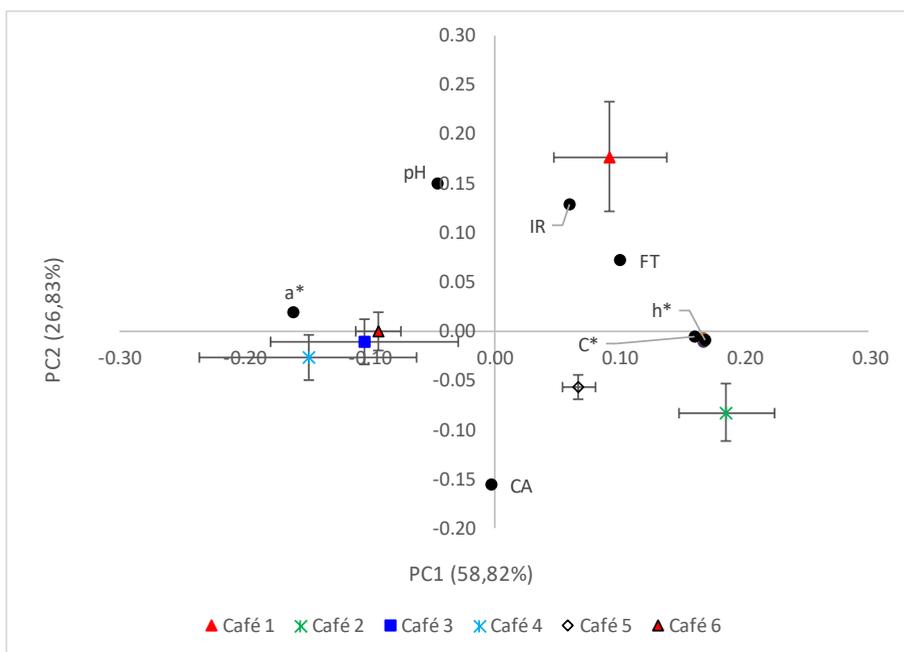


Figura III. 2. Biplot parámetros fisicoquímicos.

Análisis voltamétrico por medio de LEV/VET.

Una vez construida la matriz de datos se realizó un análisis de componentes principales para evaluar la existencia de relación entre las señales voltamétricas obtenidas para cada una de las muestras. En la Figura III.3. se muestra la representación gráfica de las 3 primeras componentes que recogieron un 86.64% de varianza total acumulada. Como se aprecia, a

excepción de los cafés 2 y 3, que quedaron agrupados juntos, el resto se distribuyó mostrando agrupaciones independientes.

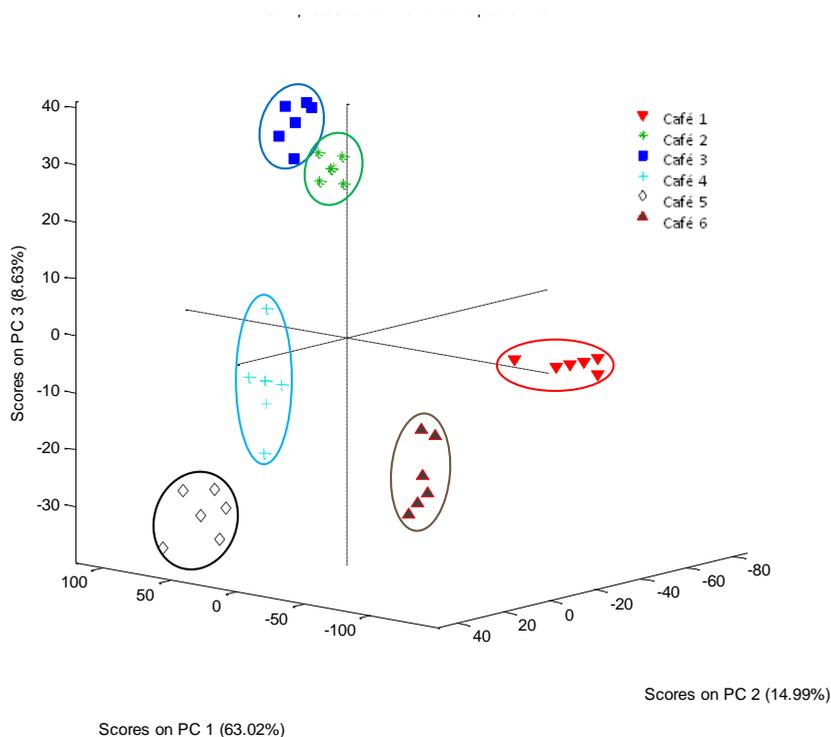


Figura III. 3. Análisis de componentes principales de las lecturas voltamétricas para todas las muestras de café.

Dada la dispersión de las muestras, la cual no coincide con los resultados obtenidos para el análisis sensorial, en el que no se observaron diferencias importantes salvo para el café 3 y 4 que fueron el mejor y peor puntuados respectivamente, y para los fisicoquímicos, en el que las diferencias fueron también menores salvo para la capacidad antioxidante total que presentó

diferencias entre todos los cafés, se procedió a la caracterización voltamétrica de estos. Para ello en un primer paso la caracterización se realizó en base a los cuatro sabores básicos, tal y como se desarrolló en el Capítulo 2. En un segundo paso la caracterización se realizó mediante un análisis de correlación multifactorial PLS entre los valores voltamétricos y cada una de las variables del análisis sensorial y fisicoquímico determinadas.

Como se observa en la Figura III.4., al igual que se mostró en el capítulo 2, la componente 1 evidenció la gran dependencia de la señal al pH de la muestra. Así todas las muestras de café quedaron agrupadas en el sector negativo de la componente 1, junto a las muestras de ácido cítrico (Figura III.4.-A.), patrón que se utilizó para caracterizar la componente ácida de los alimentos. Recordar que la acidez es uno de los atributos a evaluar en un análisis sensorial realizado por paneles de cata especializados en definir las propiedades organolépticas de muestras de café (Salamanca, Fiol, González, Saez, & Villaescusa, 2017). Por otro lado, los cafés vienen marcados por la presencia de cafeína. Así en la Figura III.4.-B., la relación de componentes 2 vs 3 muestra como los cafés quedan agrupados en la zona positiva del PC2, al igual que la cafeína, si bien en la parte negativa del PC3. La agrupación en la zona negativa del PC3 sería debida a la presencia del alto contenido en potasio, magnesio y fósforo (>100 mg/100 g m.s.) y moderado de sodio y calcio (>1 mg/100 g m.s.), que tiene el café (G. H. H. De Oliveira et al., 2014; M. Oliveira et al., 2012), que harían que estos tendiesen hacia la zona marcada por la presencia de sal (Figura III.4.-C).

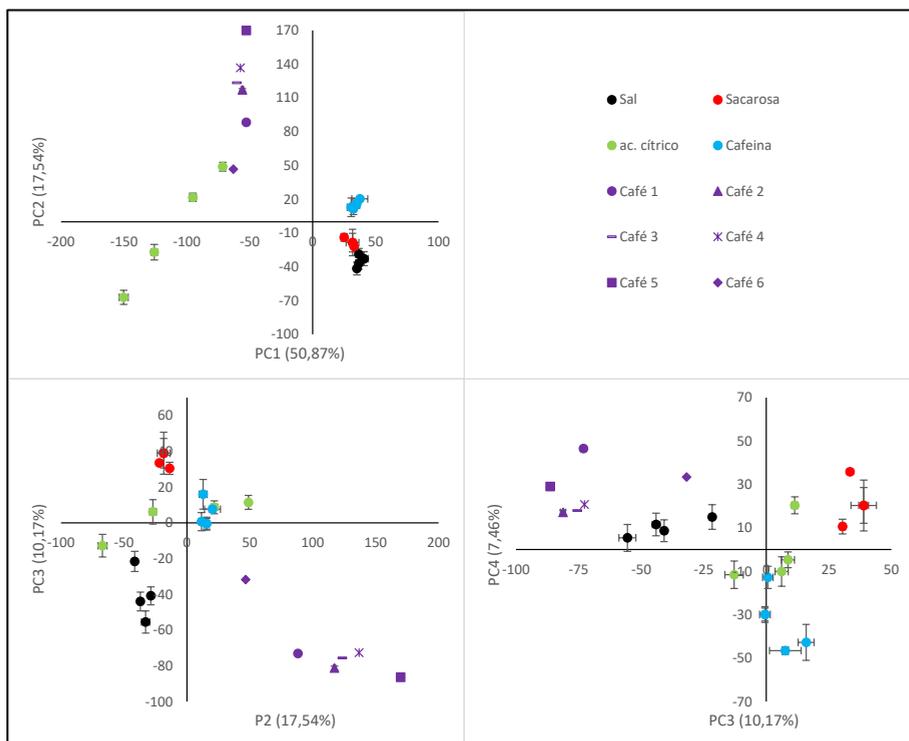


Figura III. 4. Caracterización de los cafés en los cuatro sabores básicos a partir de la información obtenida en el Capítulo 2.

Observados los comportamientos voltamétricos y las características de los cafés, se procedió a evaluar la relación existente entre las medidas voltamétricas y los resultados de los análisis fisicoquímicos y sensoriales. Como se observa en la Tabla III.3., los modelos desarrollados que obtuvieron valores de RMSECV, Bias CV y R^2 CV que los hacen válidos para la predicción fueron, en el caso de las variables de los análisis fisicoquímicos el pH y la capacidad antioxidante (CA) con unos valores de R^2 de 0,842 y 0,947 respectivamente. Para las variables procedentes del análisis sensorial fueron

uniformidad, balance y taza limpia, con valores de R^2 superiores a 0,928 todos ellos.

Como se observa en la Figura III.5., en la que se muestran las representaciones gráficas de los valores observados frente a los predichos para los valores de pH, CA, uniformidad y puntuación total, los valores predichos para el pH y la CA se ajustaron muy bien a la recta $x=y$, reflejando la gran dependencia de la respuesta voltamétrica con el pH y la expresión de la capacidad antioxidante, que le hace ser un buen dispositivo para expresar estas características. De hecho, el primer electrodo selectivo que se desarrolló fue para medir el pH de soluciones, mientras que son numerosos los estudios en los que se ha utilizado algún tipo de electrodo para determinar la capacidad antioxidante de sustancias como bebidas alcohólicas (G. Toro, López, & Taipe, 2011), especias (Ziyatdinova & Budnikov, 2014), líquidos corporales (Chevion, Berry, Kitrossky, & Kohen, 1997; Psotová, Zahálková, Hrbáč, Šimánek, & Bartek, 2001), tejidos animales (S Chevion, Or, & Berry, 1999), de plantas (Chevion, Chevion, Chock, & Beecher, 1999) y frutos (Baldeón et al., 2015; Hoyle & Santos, 2010). La Figura III.6. muestra los valores VIP de los loadings, los cuales proporcionan información sobre los segmentos (electrodos y pulsos) que contribuyen en mayor proporción en la construcción del modelo. Al igual que en la Tabla I.1 del Capítulo 1 ya se mencionó el electrodo de Au como el que mayor información relacionada con sustancias antioxidantes provee en comparación con los demás electrodos que conforman la lengua electrónica, en este caso también fue así. De igual forma, el electrodo de Au también aportó información relevante para el modelo pH (Figura III.5.). La explicación a esta doble relación podría venir dada por la naturaleza de los agentes

antioxidantes del café, muchos de ellos ácidos como los clorogénicos y los hidroxinámicos (Leroy et al., 2006)

El resto de variables fisicoquímicas no presentaron correlación con la respuesta voltamétrica dado que los valores de estas variables fueron similares entre las muestras y por tanto no mostrando una variación como la que si se da con la respuesta voltamétrica.

En el caso de los modelos desarrollados para expresar la relación voltamétrica con la característica uniformidad, balance y taza limpia, estos deben de ser interpretados con un elevado grado de incertidumbre hasta nuevos estudios, dado que como se observa en la Figura III.5., para la uniformidad, como ejemplo de los tres, el ajuste se da entre dos valores dado que en la cata todos los cafés se evaluaron como 10 a excepción del café 4 que lo fue con un valor de 8. En cambio, el modelo obtenido para expresar la puntuación total, que presentó un valor de R^2 de 0,611, generó unos valores predichos los cuales se ajustaron perfectamente a la recta $x=y$ (Figura III.5.), con valores de Bias de 0,32, inferiores a la desviación estándar obtenida por los cafés para los valores reales de PT (Tabla III.3.). Esto podría mostrar la posible modelización de la respuesta voltamétrica para predecir esta característica, en la que se obtendrían valores similares para cafés sin diferencias significativas entre ellos, como ocurre para los cafés 1, 2, 5 y 6, pero si diferentes como ocurre entre estos y los de los cafés 3 y 4., situados ambos a los extremos del ajuste. Si bien esta posibilidad debería ser evaluada en sucesivas experiencias, de igual manera para los parámetros fisicoquímicos de color (L^* , a^* , b^* y h^*).

Tabla III. 3. Valores de correlación PLS obtenidos para los modelos de predicción de las variables fisicoquímicas y sensoriales a partir de la respuesta voltamétrica de la lengua electrónica.

	<i>RMSECV</i>	<i>Bias CV</i>	<i>R² CV</i>
<i>pH</i>	0.03800	-0.0013	0.842
<i>FT</i>	23.93380	-0.0117	0.416
<i>IR</i>	0.00024	0.0000	0.268
<i>L*</i>	1.06895	0.0000	0.621
<i>a*</i>	0.71745	-0.0046	0.613
<i>b*</i>	1.77113	0.0299	0.628
<i>C*</i>	0.90374	0.0162	0.546
<i>h*</i>	2.73039	0.1413	0.651
<i>CA</i>	1.16652	0.0616	0.947
<i>Frag/aroma</i>	0.57180	0.0083	0.042
<i>Sabor</i>	1.04140	-0.0027	0.259
<i>Sabor Residual</i>	1.42317	0.10818	0.467
<i>Acidez</i>	0.85535	0.00960	0.199
<i>Cuerpo</i>	0.81047	0.01012	0.179
<i>Uniformidad</i>	0.20618	-0.0107	0.933
<i>Balance</i>	0.20618	-0.0107	0.933
<i>Taza Limpia</i>	0.20934	-0.0100	0.928
<i>Dulzor</i>	0.32072	-0.0216	0.233
<i>Punt. Cata.</i>	0.96882	-0.00202	0.225
<i>PT</i>	2.04501	-0.32013	0.611

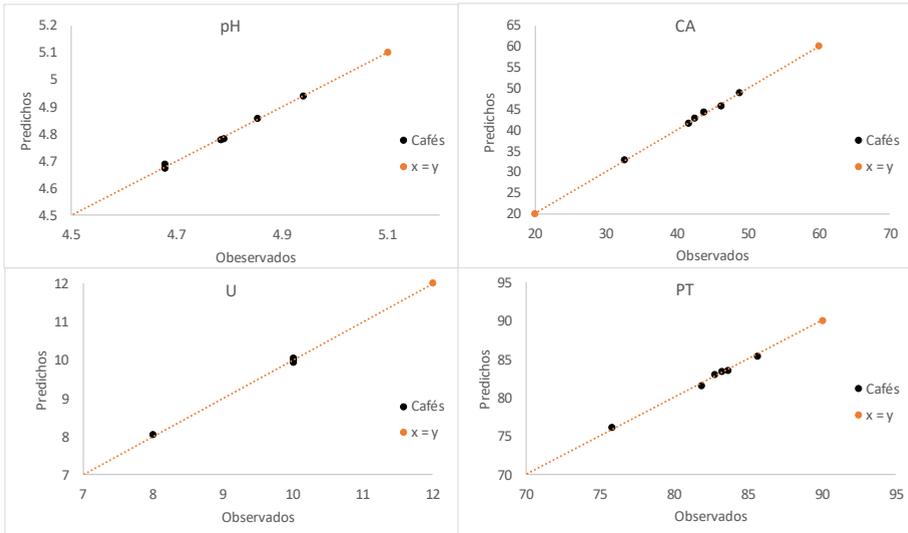


Figura III. 5. Representación gráfica de los valores medidos de pH, capacidad antioxidante (CA), uniformidad (U) y puntuación total (PT) frente a los predichos al aplicar los modelos matemáticos desarrollados mediante el PLS.

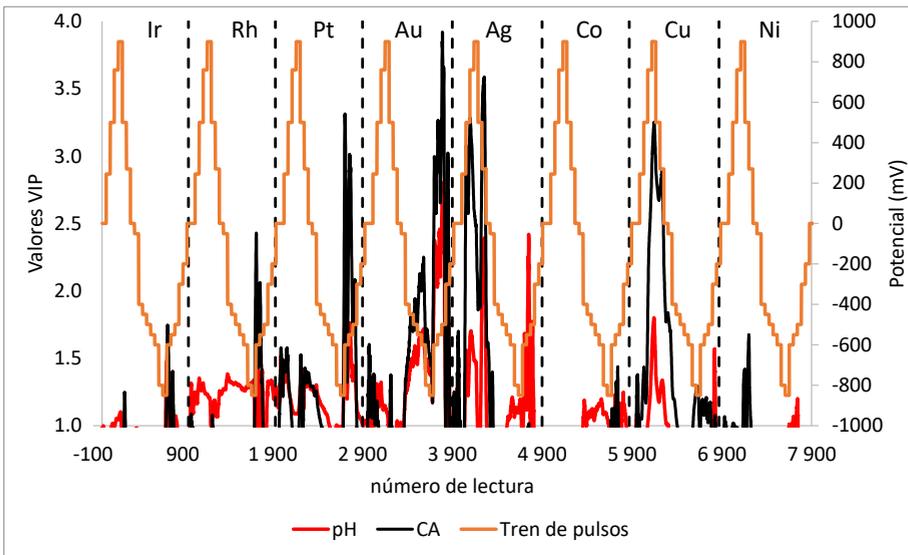


Figura III. 6. Representación del análisis VIP para las variables pH y capacidad antioxidante, así como del tren de pulso aplicado.

CONCLUSIONES.

La evaluación de la capacidad de la lengua electrónica voltamétrica como herramienta para la caracterización de cafés ha mostrado como esta puede evaluar la característica de pH y capacidad antioxidantes de estos. Además, la correlación obtenida para la puntuación global de los análisis sensoriales, si bien no han sido lo suficientemente elevadas para poderlas considerar como correctas, si podrían reflejar la posible capacidad de la lengua para caracterizar dicha característica. En cualquier caso, nuevos estudios son necesarios para evaluar la capacidad de la lengua electrónica voltamétrica como herramienta para la descripción organoléptica de cafés. Para ello será necesario obtener cafés en los que el panel de cata entrenado describa diferencias sensoriales que permitan, en su caso, obtener modelos descriptores, así como analíticas que describan el aroma de estos.

REFERENCIAS.

- Alves, R. C., Casal, S., & Oliveira, M. B. P. P. (2010). Tocopherols in coffee brews: Influence of coffee species, roast degree and brewing procedure. *Journal of Food Composition and Analysis*, 23(8), 802–808. <http://doi.org/10.1016/j.jfca.2010.02.009>
- 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 camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaug) and tumbo (*Passiflora mollissima* (Kunth) L.H. Bailey) juices employing voltammetric electronic tongues. *Food Control*, 54, 181–187. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.01.044>

- Bertrand, B., Boulanger, R., Dussert, S., Ribeyre, F., Berthiot, L., Descroix, F., & Joët, T. (2012). Climatic factors directly impact the volatile organic compound fingerprint in green Arabica coffee bean as well as coffee beverage quality. *Food Chemistry*, 135(4), 2575–2583. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.06.060>
- Bicho, N. C., Lidon, F. C., Ramalho, J. C., & Leitão, A. E. (2013). Quality assessment of Arabica and Robusta green and roasted coffees - A review. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 25(12), 945–950. <http://doi.org/10.9755/ejfa.v25i12.17290>
- Bravo, J., Monente, C., Juárez, I., De Peña, M. P., & Cid, C. (2013). Influence of extraction process on antioxidant capacity of spent coffee. *Food Research International*, 50(2), 610–616. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.04.026>
- Buratti, S., Sinelli, N., Bertone, E., Venturello, A., Casiraghi, E. (2015). Discrimination between washed Arabica, natural Arabica and Robusta coffees by using near infrared spectroscopy, electronic nose and electronic tongue analysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95 (2015), pp. 2192–2200.
- Cämmerer, B., & Kroh, L. W. (2006). Antioxidant activity of coffee brews. *European Food Research and Technology*, 223(4), 469–474. <http://doi.org/10.1007/s00217-005-0226-4>
- Caporaso, N., Genovese, A., Canela, M. D., Civitella, A., & Sacchi, R. (2014). Neapolitan coffee brew chemical analysis in comparison to espresso, moka and American brews. *Food Research International*, 61, 152–160. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.01.020>
- Chalfoun, S. M., Pereira, M. C., Carvalho, G. R., Pereira, A. A., Savian, T. V., & Deila Magna dos Santos Botelho. (2013). SENSORIAL CHARACTERISTICS OF COFFEE (*Coffea arabica* L.) VARIETIES IN THE ALTO PARANAÍBA REGION. *Coffee Science*, 8(1), 43–52.

- Chemining, G. (2015). Sensory Attributes of Coffee under Different Shade Regimes and Levels of Management, *46*(2005), 19–26.
- Chevion, S., Berry, E. M., Kitrossky, N., & Kohen, R. (1997). Evaluation of plasma low molecular weight antioxidant capacity by cyclic voltammetry. *Free Radical Biology and Medicine*, *22*(3), 411–421. [http://doi.org/10.1016/S0891-5849\(96\)00337-1](http://doi.org/10.1016/S0891-5849(96)00337-1)
- Chevion, S., Chevion, M., Chock, P. B., & Beecher, G. R. (1999). Antioxidant Capacity of Edible Plants: Extraction Protocol and Direct Evaluation by Cyclic Voltammetry. *Journal of Medicinal Food*, *2*(1), 1–10. <http://doi.org/10.1089/jmf.1999.2.1>
- Chevion, S., Or, R., & Berry, E. M. (1999). The antioxidant status of patients subjected to total body irradiation. *Biochemistry and Molecular Biology International*, *47*(6), 1019–1027.
- Contreras-Calderón, J., Mejía-Díaz, D., Martínez-Castaño, M., Bedoya-Ramírez, D., López-Rojas, N., Gómez-Narváez, F., Vega-Castro, O. (2016). Evaluation of antioxidant capacity in coffees marketed in Colombia: Relationship with the extent of non-enzymatic browning. *Food Chemistry*, *209*, 162–170. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.04.038>
- De Oliveira, G. H. H., Corrêa, P. C., Santos, F. L., Vasconcelos, W. L., Júnior, C. C., Baptestini, F. M., & Vargas-Elías, G. A. (2014). Caracterização física de café após torrefação e moagem. *Semina: Ciências Agrárias*, *35*(4), 1813–1827. <http://doi.org/10.5433/1679-0359.2014v35n4p1813>
- Di Bella, G., Potorti, A. G., Lo Turco, V., Saitta, M., & Dugo, G. (2014). Plasticizer residues by HRGC-MS in espresso coffees from capsules, pods and moka pots. *Food Control*, *41*(1), 185–192. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.01.026>

- Díaz Noguera, A. L., & Perdomo Reyes, A. M. (2015). Caracterización físico-química y sensorial de dos variedades de café (*Coffea arabica*) del occidente de Honduras.
- Dong, W., Zhao, J., Hu, R., Dong, Y., & Tan, L. (2017). Differentiation of Chinese robusta coffees according to species, using a combined electronic nose and tongue, with the aid of chemometrics. *Food Chemistry*, 229, 743–751. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.02.149>
- Esquivel, P., & Jiménez, V. M. (2012). Functional properties of coffee and coffee by-products. *Food Research International*, 46(2), 488–495. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.05.028>
- Fuentes, E., Alcañiz, M., Contat, L., Baldeón, E. O., Barat, J. M., & Grau, R. (2017). Influence of potential pulses amplitude sequence in a voltammetric electronic tongue (VET) applied to assess antioxidant capacity in aliso. *Food Chemistry*, 224, 233–241. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.12.076>
- G. Toro, A. L. R., López, F. V., & Taipe, G. M. (2011). Assessment of the Antioxidant Activity of Peruvian Pisco Through Cyclic Voltammetry. *Rev Soc Quim Perú*, 77(2), 127–134.
- Hoyle, C. H. V, & Santos, J. H. (2010). Cyclic voltammetric analysis of antioxidant activity in citrus fruits from Southeast Asia. *International Food Research Journal*, 17(4), 937–946.
- Jokanovic, M., Dzinic, N., Cvetkovic, B., Grujic, S., & Odzakovic, B. (2012). Changes of physical properties of coffee beans during roasting. *Acta Periodica Technologica*, 342(43), 21–31. <http://doi.org/10.2298/APT1243021J>
- Karamać, M., Buciński, A., Pegg, R. B., & Amarowicz, R. (2005). Antioxidant and antiradical activity of ferulates. *Czech Journal of Food Sciences*, 23(2), 64–68. <http://doi.org/10.3390/antiox2040230>

- Kocadağlı, T., & Gökmen, V. (2016). Effect of roasting and brewing on the antioxidant capacity of espresso brews determined by the QUENCHER procedure. *Food Research International*, 89, 976–981. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.03.004>
- Kuit, M., Jasen, D. M., & Van Thiet, N. (2004). Manual for Arabica cultivation, 213.
- Kuskoski, E. M., Asuero, A. G., Troncoso, A. M., Mancini-Filho, J., & Fett, R. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciência E Tecnologia de Alimentos*, 25(4), 726–732. <http://doi.org/10.1590/S0101-20612005000400016>
- Leroy, T., Ribeyre, F., Bertrand, B., Charmetant, P., Dufour, M., Montagnon, C., Pot, D. (2006). Genetics of coffee quality. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 18(1), 229–242. <http://doi.org/10.1590/S1677-04202006000100016>
- Liu, Y., & Kitts, D. D. (2011). Confirmation that the Maillard reaction is the principle contributor to the antioxidant capacity of coffee brews. *Food Research International*, 44(8), 2418–2424. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.12.037>
- Lopetcharat, K., Kulapichitr, F., Suppavorasatit, I., Chodjarusawad, T., Phatthara-aneksin, A., Pratontep, S., Borompichaichartkul, C. (2016). Relationship between overall difference decision and electronic tongue: Discrimination of civet coffee. *Journal of Food Engineering*, 180, pp. 60–68.
- Ludwig, I. A., Bravo, J., De Peña, M. P., & Cid, C. (2013). Effect of sugar addition (torrefacto) during roasting process on antioxidant capacity and phenolics of coffee. *LWT - Food Science and Technology*, 51(2), 553–559. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.12.010>

- Ludwig, I. A., Sanchez, L., Caemmerer, B., Kroh, L. W., De Peña, M. P., & Cid, C. (2012). Extraction of coffee antioxidants: Impact of brewing time and method. *Food Research International*, 48(1), 57–64. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.02.023>
- Maris, S., Maria, C., Abreu, P. De, Menezes, H. C. De, Henrique, M., Marli, C., O, D. E. C. (2005). Effect of Processing and Roasting. *Ciencia Y Tecnología de Alimentos*, 25(2), 387–393.
- Naranjo, M., Vélez, L. T., & Rojano, B. A. (2011). Actividad antioxidante de café Colombiano de diferentes calidades. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 16(2), 164–173.
- Oestreich-Janzen, S. (2010). Chemistry of Coffee. *Comprehensive Natural Products II Chemistry and Biology*. Elsevier Inc. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/B978-008045382-8.00708-5>
- Oliveira, M., Casal, S., Morais, S., Alves, C., Dias, F., Ramos, S., Beatriz, M. (2012). Intra- and interspecific mineral composition variability of commercial instant coffees and coffee substitutes: Contribution to mineral intake. *Food Chemistry*, 130(3), 702–709. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.07.113>
- Parenti, A., Guerrini, L., Masella, P., Spinelli, S., Calamai, L., & Spugnoli, P. (2014). Comparison of espresso coffee brewing techniques. *Journal of Food Engineering*, 121(1), 112–117. <http://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.08.031>
- Pérez-Martínez, M., Caemmerer, B., De Peña, M. P., Concepción, C., & Kroh, L. W. (2010). Influence of brewing method and acidity regulators on the antioxidant capacity of coffee brews. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(5), 2958–2965. <http://doi.org/10.1021/jf9037375>
- Piccino, S., Boulanger, R., Descroix, F., & Sing, A. S. C. (2014). Aromatic composition and potent odorants of the “specialty coffee” brew “Bourbon Pointu” correlated to its three trade classifications. *Food*

- Research International, 61, 264–271.
<http://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.07.034>
- Psotová, J., Zahálková, J., Hrbáč, J., Šimánek, V., & Bartek, J. (2001). Determination of total antioxidant capacity in plasma by cyclic voltammetry. Two case reports. *Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacký, Olomouc, Czechoslovakia*, 145(2), 81–83.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9–10), 1231–1237. [http://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](http://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
- Rodríguez, J., Durán, C., & Reyes, A. (2010). Electronic nose for quality control of Colombian coffee through the detection of defects in “Cup Tests.” *Sensors*, 10(1), 36–46. <http://doi.org/10.3390/s100100036>
- Ropodi, A. I., Panagou, E. Z., & Nychas, G. J. E. (2016). Data mining derived from food analyses using non-invasive/non-destructive analytical techniques; determination of food authenticity, quality & safety in tandem with computer science disciplines. *Trends in Food Science and Technology*, 50, 11–25. <http://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.01.011>
- Salamanca, C. A., Fiol, N., González, C., Saez, M., & Villaescusa, I. (2017). Extraction of espresso coffee by using gradient of temperature. Effect on physicochemical and sensorial characteristics of espresso. *Food Chemistry*, 214, 622–630. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.07.120>
- Santos, J. R., Viegas, O., Páscoa, R. N. M. J., Ferreira, I. M. P. L. V. O., Rangel, A. O. S. S., & Lopes, J. A. (2016). In-line monitoring of the coffee roasting process with near infrared spectroscopy: Measurement of sucrose and colour. *Food Chemistry*, 208, 103–110. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.03.114>

- Sepúlveda, W. S., Chekmam, L., Maza, M. T., & Mancilla, N. O. (2016). Consumers' preference for the origin and quality attributes associated with production of specialty coffees: Results from a cross-cultural study. *Food Research International*, 89, 997–1003. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.03.039>
- Severini, C., Ricci, I., Marone, M., Derossi, A., de Pilli, T. (2015). Changes in the aromatic profile of espresso coffee as a function of the grinding grade and extraction time: A study of the electronic nose system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63 (2015), pp. 2321–2327.
- Summa, C. A., de la Calle, B., Brohee, M., Stadler, R. H., & Anklam, E. (2007). Impact of the roasting degree of coffee on the in vitro radical scavenging capacity and content of acrylamide. *LWT - Food Science and Technology*, 40(10), 1849–1854. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2006.11.016>
- Várvölgyi, E., Gere, A., Szöllősi, D., Sipos, L., Kovács, Z., Kókai, Z., Korány, K. (2014). Application of Sensory Assessment, Electronic Tongue and GC - MS to Characterize Coffee Samples. *Arabian Journal for Science and Engineering*, 40(1), 125–133. <http://doi.org/10.1007/s13369-014-1489-5>
- Vignoli, J. A., Viegas, M. C., Bassoli, D. G., & Benassi, M. de T. (2014). Roasting process affects differently the bioactive compounds and the antioxidant activity of arabica and robusta coffees. *Food Research International*, 61, 279–285. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.06.006>
- Villarino, C. B. J., Jayasena, V., Coorey, R., Chakrabarti-Bell, S., Foley, R., Fanning, K., & Johnson, S. K. (2015). The effects of lupin (*Lupinus angustifolius*) addition to wheat bread on its nutritional, phytochemical and bioactive composition and protein quality. *Food Research International*, 76(P1), 58–65. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.11.046>

- Wang, N. (2012). Physicochemical Changes of Coffee Beans During Roasting, 1–100.
- Weatherall, I. L., & Coombs, B. D. (1992). Skin color measurements in terms of CIELAB color space values. *The Journal of Investigative Dermatology*, 99(4), 468–473. <http://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12616156>
- Wei, F., Furihata, K., Koda, M., Hu, F., Miyakawa, T., & Tanokura, M. (2012). Roasting process of coffee beans as studied by nuclear magnetic resonance: Time course of changes in composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(4), 1005–1012. <http://doi.org/10.1021/jf205315r>
- Ziyatdinova, G. K., & Budnikov, H. C. (2014). Evaluation of the Antioxidant Properties of Spices by Cyclic Voltammetry. *Journal of Analytical Chemistry*, 69(10), 1086–1093. <http://doi.org/10.1134/S1061934814100189>

CAPÍTULO IV

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

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 termorresistentes. Para ello, se llevaron a cabo análisis físico-químicos, microbiológicos, así como también ensayos con el equipo de lenguas electrónica voltamétrica. Se dispuso de un zumo de naranja previamente inoculado con *Alicyclobacillus acidoterrestris* y *Alicyclobacillus hesperidum* del cual se evaluó su evolución durante 16 días. El pH y los °Brix no mostraron variaciones significativas a lo largo del 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, si bien ambos fueron independientes del crecimiento bacteriano. El análisis mediante la herramienta estadística MSPC (Multivariate Statistical Process Control) mostró como el equipo voltamétrico es capaz de identificar las ligeras alteraciones en muestras de zumo de naranja producidas por la presencia de bacterias, si bien estas alteraciones son enmascaradas cuando se producen variaciones en la concentración de ácido ascórbico, debido a la gran dependencia de la respuesta voltamétrica relacionado con éste, permitió obtener un modelo matemático para cuantificarlo.

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

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 9.631 millones de litros en 2015.

AIJN ha cuantificado el mercado español de zumos y néctares en el año 2015, en 941 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 (AIJN, 2016).

La mayor cantidad de naranja producida en Europa, aproximadamente un 80% es proveniente de Italia y España. En España un 90% de la producción de naranja se encuentra en la zona de Valencia y Andalucía. El consumo per cápita aproximado en España es de 20Kg de estos la mayoría se atribuye a naranja fresca y otra poca a naranja procesada, (Bickford, Valverde, & Specialist, 2015)

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 (Osopale, Witthuhn, Albertyn, & Oguntoyinbo, 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, 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 & 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 & Escuder-Gilabert, 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 & Escuder-Gilabert, 2013).

En este sentido, uno de los enfoques más prometedores es la utilización de sistemas químicos multi sensor (en lugar de sensores discretos). Estos

sistemas químicos multi sensor son conocidos como narices electrónicas y lenguas electrónicas.

Las lenguas electrónicas se están volviendo más y más populares como técnicas objetivas automatizadas no destructivas para caracterizar procesados que se llevan a cabo en la industria alimentaria. En este sentido las lenguas electrónicas se están estudiando para la caracterización del procesado de yogurt (Z. Wei, Zhang, Wang, & Wang, 2017), control de alteraciones en productos elaborados con carne de vaca (Apetrei & Apetrei, 2016), descriptores sensoriales en vino (Cetó, González-Calabuig, Capdevila, Puig-Pujol, & Del Valle, 2015), calidad de aguas (Campos, Alcañiz, Aguado, et al., 2012), clasificación de diferentes muestras de miel (L. A. Dias et al., 2008), control del polen de la miel (L. G. Dias et al., 2015), calidad y tiempo de almacenamiento de la leche (Z. Wei, Wang, & Zhang, 2013), etc.

Así, en el presente trabajo se establece como objetivo evaluar la capacidad de la lengua electrónica (voltimetría 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.

MATERIAL Y MÉTODOS.

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:5324) y *Alicyclobacillus hesperidum* (CECT:7094) de la Colección Española de Cultivos Tipo (Universidad de Valencia, Burjassot, Valencia). Las cepas se adquirieron en forma de liofilos.

Preparación de las muestras.

Para la realización del estudio, el zumo una vez mezclado de forma homogénea, fue trasvasado de forma aséptica a botellas de 250 mL estériles. Parte de las botellas fueron inoculadas con las cepas, mientras las no inoculadas se utilizaron como control.

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 (Wibowo, Grauwet, Kebede, Hendrickx, & Van Loey, 2015).

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).

Determinaciones físico-químicas

Cada día de toma de muestra se realizaron las determinaciones descritas en este apartado, al menos por triplicado, para el zumo control y el inoculado.

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.

Determinación de los grados Brix.

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).

Determinación de la acidez total.

La determinación de la acidez total de las muestras expresada como la concentración de ácido cítrico en el zumo (gramos de ácido cítrico en 100 mL 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 (Tamang et al., 2012). 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).

Determinación de la concentración de ácido ascórbico

La concentración de ácido ascórbico (gramos 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, Santos, Daghasanli, & Thedei, 2001). El viraje se detecta por la aparición de una tonalidad verde parduzca en la muestra de zumo.

Determinaciones voltamétricas (lengua electrónica)

El presente estudio se llevó a cabo mediante una nueva versión del equipo utilizado en los anteriores ensayos, este equipo consta de un sistema de limpieza electroquímica que se sirve de diferentes potenciales específicos y soluciones ácidas o básicas con la finalidad de eliminar los residuos generados en cada uno de los electrodos de trabajo (Ir, Rh, Pt y Au) a lo largo de los ensayos, además de su funcionamiento semi automático conformado por electroválvulas que toman la muestra o las soluciones de limpieza dependiendo de la etapa del proceso.

Para esta experiencia específicamente la configuración de pulsos empleada 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.

Análisis estadístico.

Con el objetivo de evaluar la existencia de diferencias significativas entre los diferentes días de toma de muestra para los valores obtenidos en los análisis fisicoquímicos y microbiológicos, se realizaron análisis de la varianza (ANOVA simple) utilizando el programa Statgraphics Centurion XVI. En aquellos casos en los que se observaron diferencias, éstas fueron evaluadas mediante el test LSD, con un nivel de confianza del 95%.

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: 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, & 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 (Verdú et al., 2016). Además, con el fin de graficar de una forma más legible los resultados, se realizó un estudio ANOVA, en función del día de lectura, de los Q-residuals obtenidos, graficándose las medias con el error estándar obtenido con éste.

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 cross validación 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), cross validación (CV), como de la predicción (P).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

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 IV.1. 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 ufc/mL zumo) durante el resto del ensayo. Valores similares fueron obtenidos por Roig-Sagués, Asto, Engers, & Hernández-Herrero (2015) donde se utilizaba una temperatura de incubación 43°C.

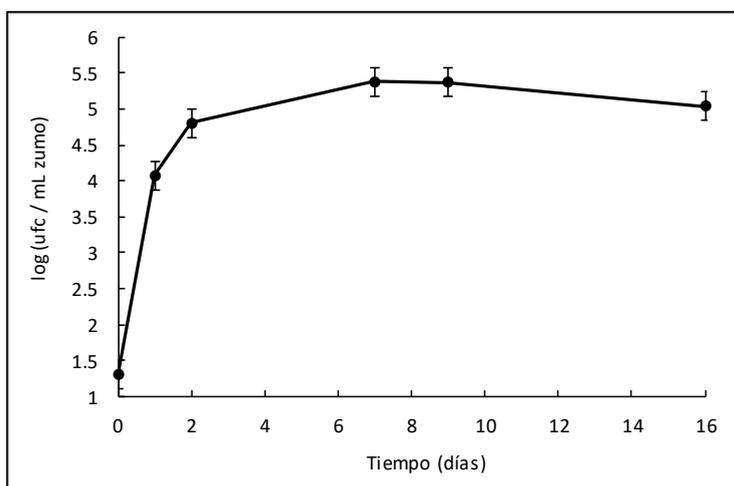


Figura IV. 1. Curva de crecimiento microbiano para la mezcla de *Alicyclobacillus acidoterrestris* y *Alicyclobacillus hesperidum* en zumo de naranja incubado a 50°C durante 25 días. Barras expresan error estándar.

La determinación del pH, así como la determinación de los grados Brix no mostraron ninguna evolución significativa en el tiempo, tanto para las

muestras control como para las inoculadas. 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 $\pm 0,05$. 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 & Kang, (2004) observaron el mismo comportamiento.

La acidez total expresada como gramos de ácido cítrico en 100mL de zumo de naranja no pareció verse modificada por el desarrollo de las bacterias, describiendo una tendencia hacia la disminución de la concentración de ácido cítrico en el lapso de tiempo estudiado, tanto para el zumo control como el inoculado (Figura IV.2). Si bien las diferencias durante los primeros 7 días no fueron significativas, fue a partir del noveno día cuando se produjo un descenso más marcado, alcanzando un valor final de 2.28 ± 0.03 g/mL de zumo.

Del mismo modo, el ácido ascórbico tampoco fue afectado de forma visible por el desarrollo de la bacteria, evolucionando de forma similar independientemente de la inoculación del zumo. Así ambos zumos mostraron la misma tendencia, una disminución de la concentración a lo largo del tiempo (Figura IV.2), si bien esta bajada fue mucho más acusada que la mostrada por el ácido cítrico, posiblemente por la facilidad de oxidación que presenta este ácido en presencia de oxígeno y temperaturas elevadas. En efecto, la presencia del oxígeno disuelto en el zumo y el presente en el espacio de cabeza de cada uno de las botellas, pueden ser factores que oxiden el ácido durante los primeros estadios de la conservación

del zumo (Wibowo, Grauwet, Santiago, et al., 2015). Cabe mencionar que, para los dos primeros días, los valores obtenidos fueron muy similares, siendo a partir del tercer día cuando se evidenció un descenso significativo. Es importante durante los primeros días ser capaces de detectar pequeñas desviaciones respecto a los valores esperados con la finalidad de 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. En este sentido, y por los datos obtenidos, el control del ácido ascórbico no sería capaz de evidenciar variaciones como consecuencia del crecimiento de las bacterias dado que estas se han desarrollado durante el primer día y el ácido ascórbico no ha variado durante éste.

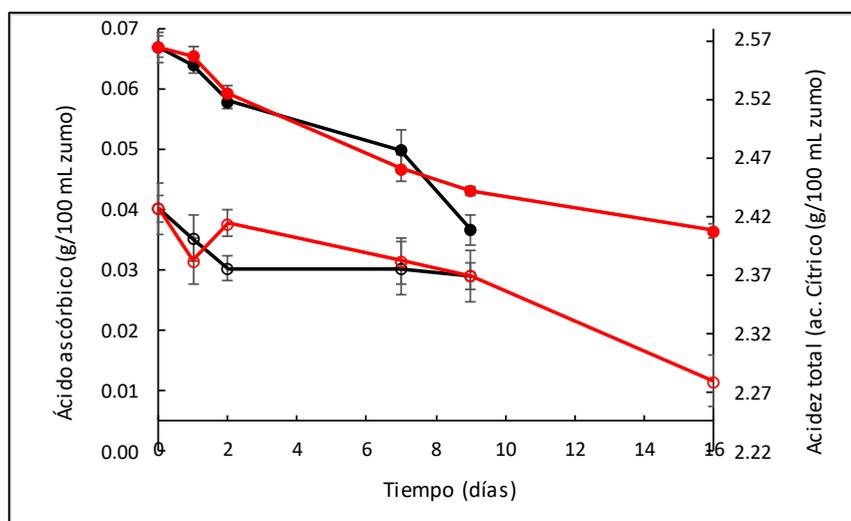


Figura IV. 2. Evolución de la concentración de ácido ascórbico (símbolo relleno) expresada en gramos/100mL de zumo de naranja, y de la concentración de ácido cítrico (símbolo sin relleno) expresada en

gramos/100mL de zumo de naranja. — Muestras control (sin inoculo); — Muestras inoculadas. Barras expresan error estándar.

Determinaciones voltamétricas

Una vez realizados todas las mediciones voltamétricas 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, dado que es durante el día 1 en el que se produce el desarrollo microbiano. 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, su Q-residual obtenido sea lo suficientemente elevado como para considerarlo diferente al de la variabilidad de las muestras a día 0, se consideran diferentes. La figura IV.3 muestra los resultados del análisis. Como puede observarse, todas las muestras, tanto control como inoculadas, tuvieron Q-residuals que las definen como diferentes, a excepción de las muestras control a día 1, las cuales tuvieron un Q-residual inferior al límite de confianza (línea roja discontinua en la Figura IV.3) e igual a ambos días 0. Este resultado podría reflejar la capacidad de LEV para detectar diferencias como consecuencia del desarrollo de las bacterias dado que para día 1, los zumos no inoculados, los cuales no tuvieron cambios significativos tanto microbiológicos como fisicoquímicos, son caracterizadas como día 0, mientras que los inoculados,

con crecimiento microbiano entre día 0 y 1, son clasificados como diferentes. Para el resto de días, tanto para los zumos control como para los inoculados, la diferenciación con respecto a día 0 podría venir dada por los cambios sufridos en el zumo como consecuencia de la temperatura del estudio que degradaría en gran medida el ácido ascórbico. Pero además, en el caso de las muestras inoculadas, también vendría dado por el crecimiento de las bacterias. Es por ello que las muestras inoculadas, para los mismos días que el control, presentan mayores valores de Q-residual, si bien esta herramienta estadista no cuantifica las diferencias.

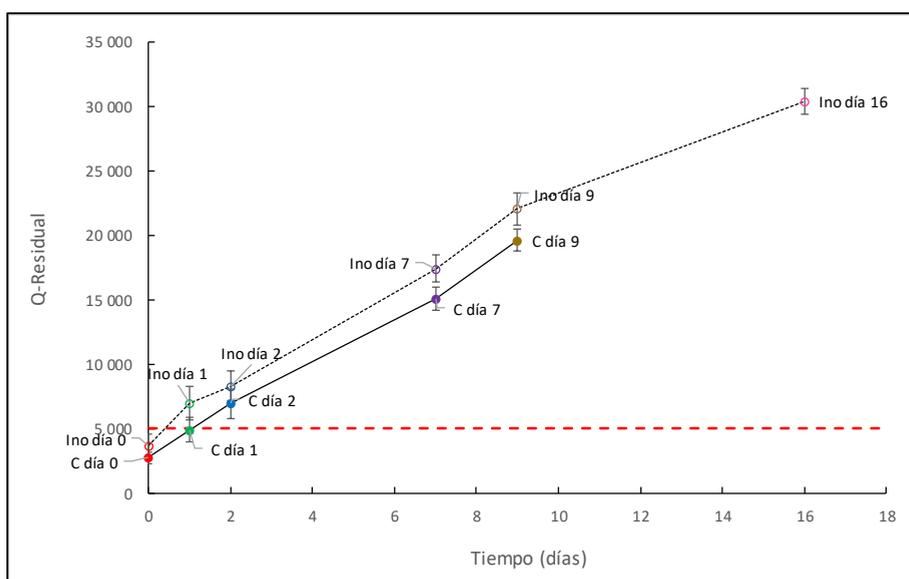


Figura IV. 3. Resultado de los Q-residuals para el estudio del día de análisis. Barras expresan error estándar.

Con la finalidad de evaluar si los cambios voltámétricos observados están ligados a las analíticas realizadas, se procedió al estudio de la posible relación existente entre las variables fisicoquímicas y microbiológicas 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 con 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 IV.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 RMSE reflejan una baja bondad de los ajustes. Así, como se puede observar en la figura IV.4, en la que a modo de ejemplo se muestra la relación entre los valores reales de carga microbiana y los predichos obtenidos tras aplicar el modelo desarrollado para su cuantificación, estos fueron erróneos desviándose de la recta $x=y$ (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 IV.5 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 IV. 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	0.0265	0.0083	0.0006
Bias	8.88E-16	4.44E-16	6.94E-18
R² Cal	0.999	0.981	0.997
RMSECV	0.6388	0.0212	0.0018
CV Bias	0.0361	-0.0003	-0.0003
R² CV	0.684	0.890	0.986
RMSEP	0.4140	0.0226	0.0020
P Bias	0.0527	-0.0066	-0.0008
R² P	0.890	0.868	0.981

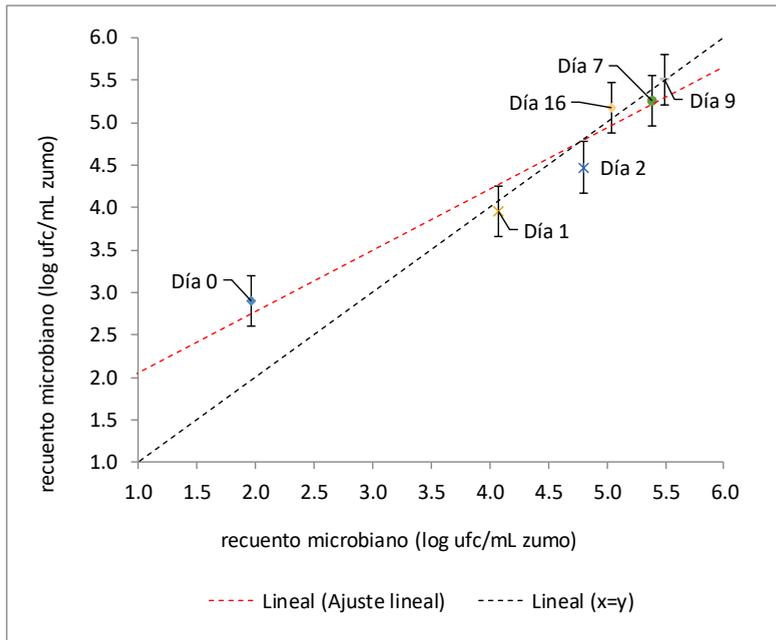


Figura IV. 4. Ajuste lineal de los valores de crecimiento microbiano (log UFC/mL de zumo) medidos vs predichos por el modelo PLS. Barras expresan error estándar.

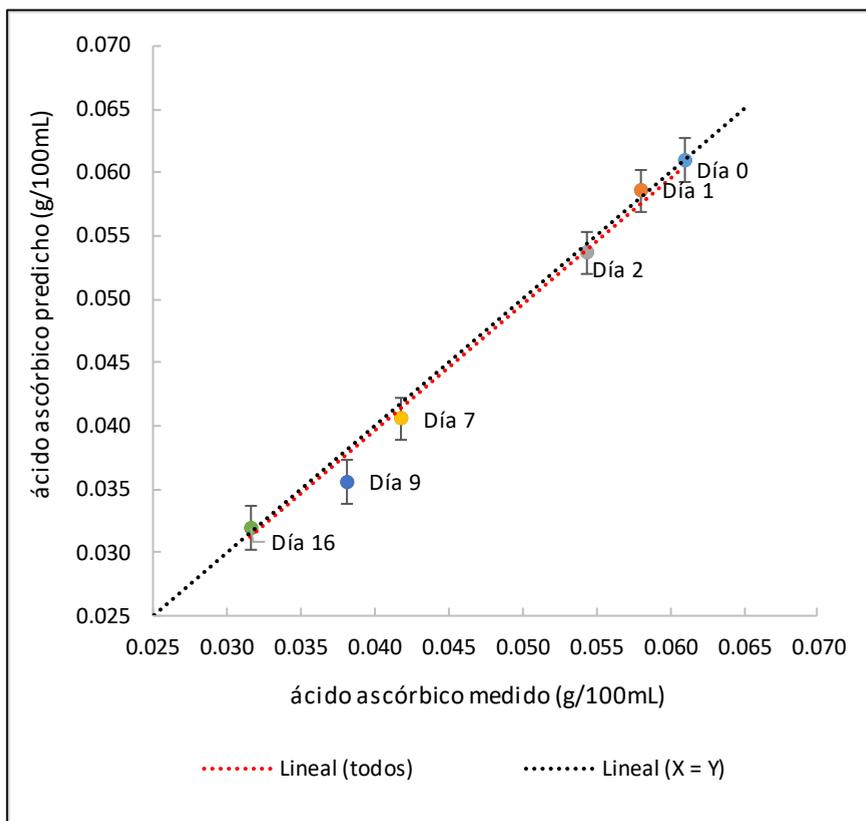


Figura IV. 5. Ajuste lineal de los valores de ácido ascórbico medidos vs predichos por el modelo PLS. Barras expresan error estándar.

La figura IV.6 C muestra el ratio de selectividad (variables más influyentes en el desarrollo del modelo) para el desarrollo del modelo matemático de predicción del ácido ascórbico y el esquema de potenciales aplicados. Como se puede observar, los mayores valores de selectividad (información más influyente) se obtuvieron fundamentalmente en los electrodos platino y oro y un poco en el de Rh, cuando se aplicaron pulsos a un potencial de 600 y 750 mV. Esta respuesta puede estar relacionada con potenciales redox (Maria-Viorica Bubulica, 2012) los cuales tienen lugar en la superficie del metal e

incrementan cuando incrementa el potencial aplicado. Maria-Viorica Bubulica (2012), observó un pico anódico alrededor entre 450 y 750 mV. Esta respuesta estuvo relacionada con la capacidad antioxidante de extractos plantas medicinales. Pisoschi, Pop, Negulescu, & Pisoschi (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, & Kariuki, (2010). Baldeón et al., 2015, encontraron picos alrededor de los 500 – 900 mV, al igual que (Vulcu, Grosan, Muresan, Pruneanu, & Olenic, 2013) a los 570 mV, ambos trabajando con un electrodo de Au, los cuales fueron relacionados con ácido ascórbico. Este resultado también estaría acorde con los resultados obtenidos en el capítulo 1, en el que las reacciones redox tanto en el patrón trolox como en la muestra aliso se daban fundamentalmente cuando se aplicaban voltajes de 500 mV en los electrodos de Pt y Au.

Si bien como se ha mostrado en la tabla IV.1 y en la figura IV.5 existe una gran relación entre la concentración en ácido ascórbico del zumo y la respuesta voltamétrica definida por el ratio de selectividad, la discriminación de los zumos en función del día de toma de muestra (Figura IV.3) no se basó en esta información, 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 IV.1). En cambio, el modelo que caracteriza las muestras a día 0 sí diferencia entre muestras a día 0 y a día 1 (Figura IV.3). La explicación la podríamos encontrar en la figura IV.6. Esta está formada por 3 gráficas. La primera gráfica (Figura IV.6.A), muestra las cargas (loadings) de las variables a día 1, 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 IV.3 para día 1. En la segunda (Figura IV.6.B) se muestran los Q-Residuals para el día 2, mientras que en la tercera (Figura IV.6.C) se muestran los ratios de selectividad para el modelo PLS de predicción del ácido ascórbico, es decir las variables con mayor peso en el modelo. Como se puede apreciar en la primera gráfica, la información utilizada a día 1 para la muestra con inóculo y la control no es la misma. Mientras que la control utiliza información procedente del electrodo de oro, al igual que lo hace el modelo de predicción de ácido ascórbico (bandas azules), para la muestra inocularada, la información utilizada es la procedente del electrodo de Ir (bandas verdes). En cambio para el día dos (segunda gráfica), tanto las muestras inocularadas como control muestran la misma información influyente, la procedente del modelo de predicción (bandas azules). Esto mostraría la gran capacidad que tiene el equipo de cuantificar el ácido ascórbico presentes en las muestras a consecuencia de su capacidad antioxidante, lo que hace que cualquier variación afecte en gran medida a la respuesta voltamétrica. Así a día 1, para la muestra inocularada, sería la presencia de la bacteria (o alguno de los metabolitos generados por esta) la que generaría el cambio en el voltagrama, pero a partir de un pequeño cambio en la cantidad de ascórbico (día 2), es este cambio el que marca la resultante del estudio y por ello todas las muestras quedan clasificadas como diferentes a las de día 0.

Estos resultados vendrían a reflejar 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 contracción de ácido ascórbico.

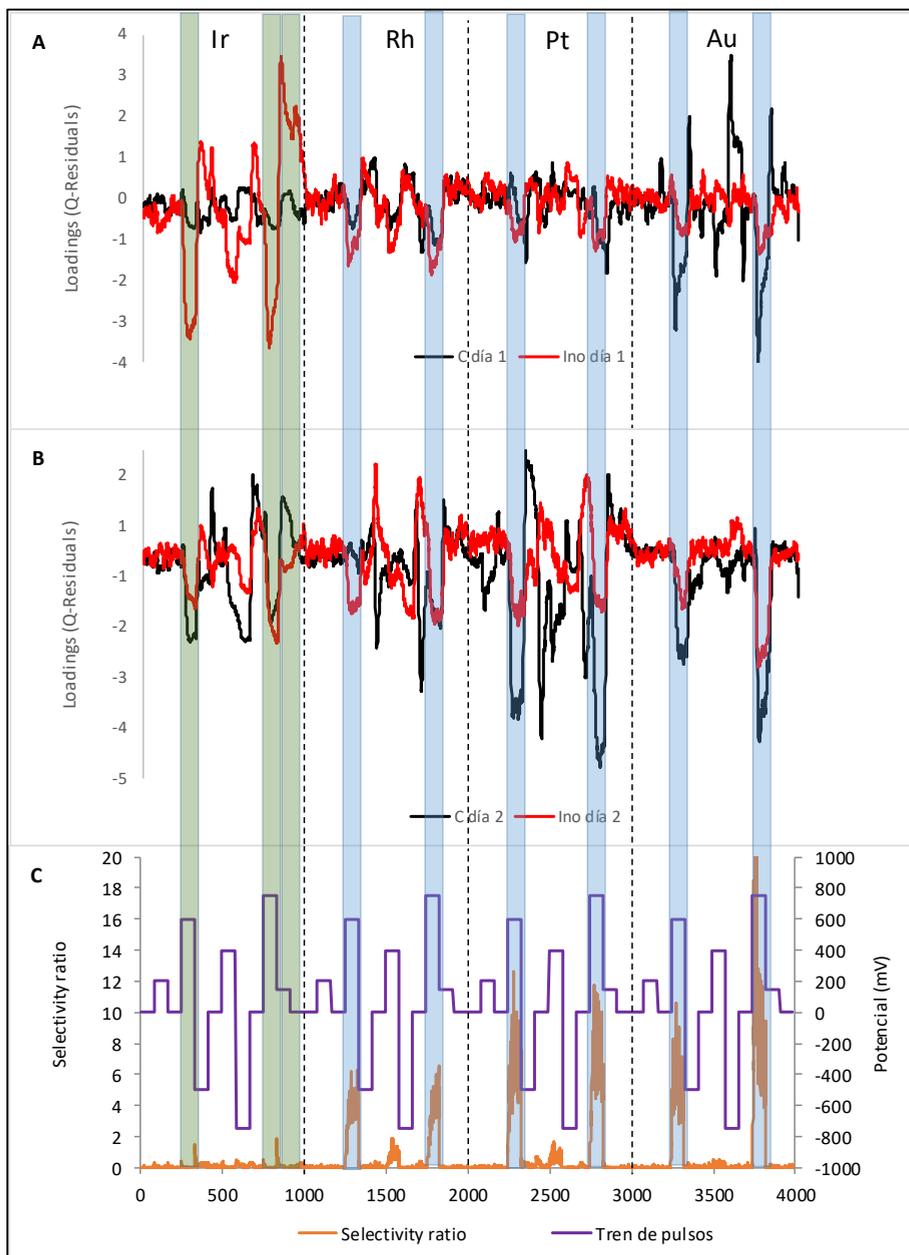


Figura IV. 6. Q-Residuals del análisis MSPC para los días 1 (A) y 2 (B) de análisis, ratio de selectividad para el desarrollo del modelo matemático de predicción del ácido ascórbico (C) y Tren de pulso aplicado (C).

CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos mediante la herramienta estadística MSPC (Multivariate Statistical Process Control) han mostrado que el equipo voltamétrico es capaz de evaluar alteraciones en muestras de zumo de naranja producidas por la presencia de las bacterias productoras de esporas termo resistentes, como son *Alicyclobacillus acidoterrestris* y *Alicyclobacillus hesperidum*, si bien son enmascaradas en el momento en el que se producen variaciones en la concentración de ácido ascórbico.

Por otro lado, mediante el análisis multivariante PLS se ha evidenciado la clara relación entre la concentración de ácido ascórbico y la respuesta voltamétrica, lo que ha permitido obtener un modelo de predicción que podría utilizarse para valorar éste, aunque estudios en este sentido serían necesarios.

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.

REFERENCIAS

- AIJN. (2016). AIJN European Fruit Juice Association. About, Presenting AIJN. Retrieved from <http://www.aijn.org/about/presenting-aijn/>
- Alcañiz, M., Vivancos, J.-L., Masot, R., Ibañez, J., Raga, M., Soto, J., & Martínez-Máñez, 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. <http://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.01.014>
- Apetrei, I. M., & Apetrei, C. (2016). Application of voltammetric e-tongue for the detection of ammonia and putrescine in beef products. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 234, 371–379. <http://doi.org/10.1016/j.snb.2016.05.005>
- 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 camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaug) and tumbo (*Passiflora mollissima* (Kunth) L.H. Bailey) juices employing voltammetric electronic tongues. *Food Control*, 54, 181–187. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.01.044>
- Bersimis, S., Psarakis, S., & Panaretos, J. (2007). Multivariate statistical process control charts: An overview. *Quality and Reliability*

- Engineering International, 23(5), 517–543.
<http://doi.org/10.1002/qre.829>
- Bickford, R., Valverde, C., & Specialist, A. (2015). Spain Spain s Citrus Report, 1–7.
- Campos, I., Alcañiz, M., Aguado, D., Barat, R., Ferrer, J., Gil, L., Vivancos, J. L. (2012). A voltammetric electronic tongue as tool for water quality monitoring in wastewater treatment plants. *Water Research*, 46(8), 2605–2614. <http://doi.org/10.1016/j.watres.2012.02.029>
- Cetó, X., González-Calabuig, A., Capdevila, J., Puig-Pujol, A., & Del Valle, M. (2015). Instrumental measurement of wine sensory descriptors using a voltammetric electronic tongue. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 207(PB), 1053–1059. <http://doi.org/10.1016/j.snb.2014.09.081>
- Chang, S.-S., & Kang, D.-H. (2004). Alicyclobacillus spp. in the fruit juice industry: history, characteristics, and current isolation/detection procedures. *Critical Reviews in Microbiology*, 30(2), 55–74. <http://doi.org/10.1080/10408410490435089>
- Ciancaglini, P., Santos, H. L., Daghanli, K. R. P., & 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(3), 110–114. [http://doi.org/10.1016/S1470-8175\(01\)00039-X](http://doi.org/10.1016/S1470-8175(01)00039-X)
- Dias, L. A., Peres, A. M., Vilas-Boas, M., Rocha, M. A., Estevinho, L., & Machado, A. A. S. C. (2008). An electronic tongue for honey classification. *Microchimica Acta*, 163(1–2), 97–102. <http://doi.org/10.1007/s00604-007-0923-8>
- Dias, L. G., Veloso, A. C. A., Sousa, M. E. B. C., Estevinho, L., Machado, A. A. S. C., & Peres, A. M. (2015). A novel approach for honey pollen profile assessment using an electronic tongue and chemometric tools. *Analytica Chimica Acta*, 900, 36–45. <http://doi.org/10.1016/j.aca.2015.10.014>

- 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(10), 1464–1474.
- Maria-Viorica Bubulica. (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. <http://doi.org/10.5897/JMPR11.1570>
- Merle, J. M. (2012). GROWTH BEHAVIOR OF ALICYCLOBACILLUS ACIDOTERRESTRIS AS A FUNCTION OF STRAIN AND CULTURE CONDITIONS. Retrieved from <https://rucore.libraries.rutgers.edu/rutgers-lib/36621/>
- Osopale, B. A., 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. <http://doi.org/10.1016/j.fm.2015.11.014>
- Peris, M., & Escuder-Gilabert, L. (2013). On-line monitoring of food fermentation processes using electronic noses and electronic tongues: A review. *Analytica Chimica Acta*, 804, 29–36. <http://doi.org/10.1016/j.aca.2013.09.048>
- 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(2), 1349–1365. <http://doi.org/10.3390/molecules16021349>
- Roig-Sagués, A. X., Asto, E., Engers, I., & Hernández-Herrero, 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. *LWT - Food Science and Technology*, 63, 866–871. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.04.056>

- Tamang, J. P., Tamang, B., Schillinger, U., Franz, C. M. A. P., Gores, M., Holzappel, W. H., Activity, H. (2012). Determination of Fruit Acids By. *Journal of Gen. Appl. Microbiol*, B 55(7), 315. <http://doi.org/10.2105/AJPH.21.3.315-a>
- 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. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.11.002>
- Vulcu, A., 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. <http://doi.org/10.1016/j.electacta.2012.10.074>
- Wei, Z., Wang, J., & Zhang, X. (2013). Monitoring of quality and storage time of unsealed pasteurized milk by voltammetric electronic tongue. *Electrochimica Acta*, 88, 231–239. <http://doi.org/10.1016/j.electacta.2012.10.042>
- Wei, Z., Zhang, W., Wang, Y., & Wang, J. (2017). Monitoring the fermentation, post-ripeness and storage processes of set yogurt using voltammetric electronic tongue. *Journal of Food Engineering*, 203, 41–52. <http://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.01.022>
- Wibowo, S., Grauwet, T., Kebede, B. T., Hendrickx, M., & Van Loey, A. (2015). Study of chemical changes in pasteurised orange juice during shelf-life: A fingerprinting-kinetics evaluation of the volatile fraction. *Food Research International*, 75, 295–304. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2015.06.020>
- Wibowo, S., Grauwet, T., Santiago, J. S., 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.
<http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.131>

CONCLUSIONES GENERALES

CONCLUSIONES GENERALES

La técnica de lengua electrónica voltamétrica ha sido aplicada con éxito en base al objetivo marcado en la tesis, pudiéndose estudiar su aplicación para la caracterización de alimentos líquidos. Para ello, en un inicio se evaluó la posible influencia de la amplitud del potencial en una secuencia (tren) de pulsos aplicada para evaluar la capacidad antioxidante de aliso. Los resultados obtenidos en este apartado permitieron determinar la capacidad antioxidante total de muestras de aliso pero además fueron de gran valía, no solo para este estudio sino también para los sucesivos estudios al definirse como tiene que ser el tren de pulsos a utilizar. Este ha de estar formado por pulsos con una diferencia de potencial alta entre ellos, si bien antes del pulso más relevante se debe aplicar otro intermedio que permite una mejor reorganización de las cargas en la interfaz superficie del electrodo/disolución, llegando a definirse una secuencia de pulso que incluye un pulso de 200mV previo al pulso de 500mV que se definió como el influyente.

Definido el tren de pulsos, se evaluó si la lengua podría ser capaz de ser usada en análisis sensorial, más concretamente como equipo capaz de cribar o pre clasificar inicialmente muestras antes de ser evaluadas por un panel de catas. Para ello, dado que no se disponía de información se trabajó en la evaluación de los 4 sabores básicos (ácido, salado, dulce y amargo), para finalmente testarla en alimentos. En este caso fueron dos frutas (kiwi y camu camu) y café soluble. Los resultados mostraron la posibilidad de que en un futuro se puedan definir lenguas voltamétricas específicas para grupos de alimentos dado que tanto las dos frutas como el café soluble quedaron descritos dentro de los cuatro sabores básicos. Además, tanto en el siguiente estudio realizado, en el que se evaluó capacidad de la lengua electrónica voltamétrica como herramienta para una primera caracterización de cafés, como en el último en el que se evaluó la capacidad de la lengua electrónica para el control de zumo de naranja pasteurizado, los resultados obtenidos mostraron como esta capacidad puede ser real. Así, en el estudio de

clasificación voltamétrica de cafés, estos quedaron clasificados en base a su pH y capacidad antioxidante no pudiéndose concluir si las expresiones observadas en la clasificación por variables sensoriales son lo suficientemente robustas para ser usadas en su clasificación, como consecuencia de la similitud sensorial de los cafés. En cambio, el equipo voltamétrico si es capaz de detectar alteraciones en muestras de zumo de naranja producidas por la presencia de las bacterias productoras de esporas termo resistentes durante los primeros estadios, si bien nuevas experiencias serían necesarias pero con desarrollo de un equipo específico para este fin.

PUBLICACIONES REALIZADAS DURANTE EL PERIODO DE REALIZACIÓN DE LA TESIS DOCTORAL

Hasta el momento de publicación de esta tesis la producción científica es la descrita a continuación.

Artículos en revistas internacionales de Investigación.

E.O. Bladeón, M. Alcañiz, R. Masot, **E.M. Fuentes**, J.M. Barat, R. Grau, Voltammetry pulse array developed to determine the antioxidant activity of camu camu (*Myrciaria dubia*(H.B.K.) McVaug) and tumbo (*Passiflora mollissima* (Kunth) L.H. Bailey) Juices employing voltammetric electronic tongues. *Food Control*. 54 (2015) 181-187.

E. Fuentes, M. Alcañiz, L. Contat, E.O. Baldeón, J.M. Barat, R. Grau, Influence of potential pulses amplitude sequence in a voltammetric electronic tongue (VET) applied to assess antioxidant capacity in aliso. *Food Chemistry* 224 (2017) 233-241.

Participación en Congresos.

E.M. Fuentes, E.O. Baldeón, M. Alcañiz, R. Masot, J.M. Barat, R. Grau. Estudio de la amplitud de los pulsos en la respuesta voltamétrica de una muestra de aliso (*alnus acuminata*), para la determinación de la capacidad antioxidante. III Congreso Internacional de Calidad y Seguridad Alimentaria Acofesal 2015. Universidad Politécnica de Valencia 10-12 de Junio 2015.

E.M. Fuentes, E.O. Baldeón, M. Alcañiz, R. Masot, J.M. Barat, R. Grau. Antioxydant capacity of camu camu (*Myciaria Dubia*), through differential pulse voltammetry. 1st International Congress of Students of food science and Technology. University of Valencia 5-6 March 2015.

P. Garcia, L. Contat, J.M. Barat, R. Grau, **E.M. Fuentes**, E. Garcia- Breijo. Determinación de agentes antioxidantes en alimentación mediante Organic

Electrochemical Transistors (OECTS). IX International Workshop on Sensors and Molecular Recognition. Valencia 7 de Julio 2015.

E.M Fuentes, E.O. Baldeón, M. Alcañiz, R. Masot, J.M. Barat, R. Grau. Implementation of different pulse set configuration to measure antioxidant capacity of aliso (*alnus acuminata*) through voltammetric electronic tongues. 2nd International & 3rd National Student Congress of Food Science and Technology. University of Valencia 3-4 March 2016.

E.M. Fuentes, O.M. Barrera, E.O. Baldeón, M. Alcañiz, R. Masot, J.M. Barat, R. Grau. A method to pre analyze coffee samples through a voltammetric electronic tongue: A Taste Essay. 3rd International & 4th National Student Congress of Food Science and Technology. University of Valencia 23 – 24 February 2017.