


Facultad de Ciencias

Grado en Química

Trabajo Fin de grado



Aplicación de la técnica NIRS para la autenticación de mieles adulteradas

Autora: Lucía Guillén Cueto

Universidad de Cádiz, curso 2016/2017

Tutoras: Estrella Espada Bellido

Marta Ferreiro González



Departamento de Química Analítica

Facultad de Ciencias

Aplicación de la técnica NIRS para la autenticación de mieles adulteradas

Lucía Guillén Cueto

Trabajo Fin de Grado

Curso 2016/2017

Aplicación de la técnica NIRS para la autenticación de mieles adulteradas

Memoria Trabajo Fin de Grado presentada por la estudiante Dña. Lucía Guillén Cueto

Fdo: Dña. Lucía Guillén Cueto

2017

DÑA. ESTRELLA ESPADA BELLIDO Y DÑA. MARTA FERREIRO GONZÁLEZ, PROFESORAS DEL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA DE LA UNIVERSIDAD DE CÁDIZ, HACEN CONSTAR:

Que el presente trabajo de investigación ha sido realizado en los laboratorios del Departamento de Química Analítica y en los laboratorios del Instituto de Investigación Vitivinícola y Agroalimentaria (IVAGRO) de la Universidad de Cádiz.

Y para que conste y surtan los efectos oportunos, firmamos la presente en Puerto Real a 17 de julio de 2017.

Estrella Espada Bellido

Marta Ferreiro González



AGRADECIMIENTOS

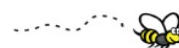
Otra etapa acabada... Parece ayer cuando aún no tenía claro que carrera estudiar y ya estoy escribiendo los agradecimientos. Son tantos momentos los que dejo atrás que es imposible que no me emocione al escribir esto, desde risas, llantos, enfados, ilusión; toda una montaña rusa de emociones.

Son muchas las personas que me han ayudado en esta etapa tan bonita y a la vez tan dura... Para empezar quiero agradecer este trabajo a mis tutoras Estrella y Marta, por ser unas tutoras excelentes y de las cuales he aprendido muchísimo. Estrella te conozco desde que empecé la carrera, tuve la gran suerte de que fueras mi tutora personal y ahora vamos a terminar juntas. Gracias por ser tan encantadora y por tener siempre un ratito para mí. Marta a ti te he conocido ahora, pero ha merecido la pena conocer a una persona tan trabajadora, perfeccionista y con ese amor a la ciencia y a la investigación.

A los compañeros de clase, en particular a Mario que aunque no ha sido fácil llegar hasta aquí para ninguno de los dos, siempre hemos tenido ese apoyo mutuo con el cual poder seguir adelante. También quiero agradecerlo a mis amigas (Ana, Irene, María, Paloma, Cris, Marina y MJose), las mejores amigas que se podía tener, que sin ellas seguramente no habría llegado hasta aquí, son capaces de cambiar un día malo por uno de los mejores de tu vida.

Por último, quiero agradecerles este trabajo a mis padres y mis hermanos por apoyar siempre mis decisiones, por proporcionarme la oportunidad de estudiar, porque sé que no ha sido fácil en muchos momentos, y por enseñarme que con esfuerzo todo se consigue.

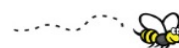
GRACIAS A TODOS





*“Anoche cuando dormía
soñé ¡bendita ilusión!
que una colmena tenía
dentro de mi corazón;
y las doradas abejas
iban fabricando en él,
con las amarguras viejas,
blanca cera y dulce miel.”*

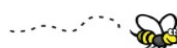
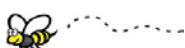
ANTONIO MACHADO





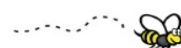
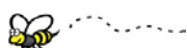
ÍNDICE

| | |
|---|----|
| 1. RESUMEN..... | 1 |
| 2. ABSTRACT..... | 3 |
| 3. INTRODUCCIÓN..... | 5 |
| 3.1. Historia y aspectos generales..... | 5 |
| 3.2. Composición y beneficios..... | 6 |
| 3.3. Regulación y Denominación de Origen..... | 6 |
| 3.3.1. Miel de Granada..... | 7 |
| 3.4. Autenticidad y adulteración de miel..... | 8 |
| 3.5 Técnicas de análisis para la autenticación y detección de adulteraciones..... | 9 |
| 3.5.1. Espectroscopía de infrarrojo cercano (NIRS)..... | 10 |
| 3.6 Técnicas quimiométricas..... | 11 |
| 3.6.1 Análisis de clusters jerárquico (HCA)..... | 11 |
| 3.6.2 Análisis de componentes principales (PCA)..... | 12 |
| 3.6.3 Análisis discriminante lineal (LDA)..... | 12 |
| 3.6.4. Regresión parcial por mínimos cuadrados (PLS)..... | 12 |
| 4. OBJETIVOS..... | 13 |
| 5. RESULTADOS..... | 14 |
| 5.1. Materiales y métodos..... | 14 |
| 5.1.1. Muestras..... | 14 |
| 5.1.1.1. Mieles..... | 14 |
| 5.1.1.2. Adulterante..... | 15 |
| 5.1.1.2. Procedimiento de adulteración..... | 15 |
| 5.1.3. Espectroscopía de infrarrojo cercano (NIRS)..... | 16 |
| 5.1.4. Análisis de datos..... | 16 |
| 5.2. Resultados y discusión..... | 17 |
| 5.2.1. Estudio de la adulteración en mieles..... | 17 |
| 5.2.1.1. Análisis de Clúster Jerárquico (HCA)..... | 18 |
| 5.2.1.2. Análisis de Componentes Principales (PCA)..... | 19 |
| 5.2.1.3. Análisis Discriminante Lineal (LDA)..... | 21 |
| 5.2.1.4. Regresión Parcial por Mínimos Cuadrados (PLS)..... | 24 |





| | |
|--|----|
| 5.2.1.5. Estudio de repetibilidad y precisión intermedia..... | 25 |
| 5.1.1.6. Estudio de la aplicabilidad del método en muestras comerciales..... | 26 |
| 5.2.2. Estudio de autenticación de las mieles en función de su origen..... | 27 |
| 5.2.2.1. Análisis de Clúster Jerárquico (HCA)..... | 27 |
| 5.2.2.2. Análisis de Componentes Principales (PCA)..... | 29 |
| 5.2.2.3. Análisis Discriminante Lineal (LDA)..... | 31 |
| 6. CONCLUSIONES..... | 32 |
| 7. BIBLIOGRAFÍA..... | 33 |
| 9. APÉNDICES..... | 37 |
| 9.1. Acrónimos..... | 37 |





1. RESUMEN

La miel es un alimento natural producido por las abejas a partir del néctar de las flores. Desde hace años, se ha utilizado como remedio natural además de como producto alimenticio por su alto valor nutricional y sus propiedades terapéuticas. La miel es rica en hidratos de carbono y compuestos fenólicos responsables de gran cantidad de efectos biológicos, actuando así como un antioxidante natural. La miel es un producto puro, al que no se le puede adicionar ninguna otra sustancia, por lo que su calidad está fundamentalmente determinada por su origen botánico y geográfico. La creación de Denominaciones de Origen de la miel y productos de elevada calidad, hace que los costes de este alimento sean mayores en comparación con otros edulcorantes comúnmente utilizados, y por lo tanto, hace a este alimento muy susceptible de ser adulterado. Hoy en día, la miel se sitúa dentro de los diez productos más adulterados del mercado junto con otros alimentos como el aceite de oliva, la leche, zumos de frutas.... La adulteración de alimentos consiste en añadir o quitar de forma premeditada alguna sustancia con fines normalmente lucrativos. Esta práctica además de ser ilegal, puesto que se trata de un fraude económico, puede tener consecuencias en la salud de los consumidores. En el caso particular de la miel, la adulteración consiste normalmente en la incorporación de azúcares más refinados, agua, enzimas, colorantes, etc.

Por esta razón, es necesario desarrollar metodologías analíticas que permitan demostrar la autenticidad de los productos que consumimos. En el presente estudio, se ha utilizado la espectroscopía de infrarrojo cercano (NIRS) en combinación con técnicas quimiométricas para la detección de adulteración en mieles, así como para garantizar la autenticidad de las mieles en función de su origen geográfico.

Para este propósito, se han adulterado muestras de miel procedentes de la Denominación de Origen Protegida de Granada con jarabe de maíz de alta fructosa a distintos porcentajes (0%-100%). Se obtuvo una clasificación del 100% al aplicar un análisis discriminante lineal (LDA). Además, se realizó una regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS), mediante el empleo de la validación cruzada con el fin de desarrollar un modelo de predicción del nivel de adulteración de las mieles. Se obtuvo un coeficiente de correlación cercano a 1 usando un total de 10 factores. Por otro lado, para la discriminación en función del origen geográfico, se analizaron muestras de miel procedentes de la Denominación de Origen de Granada, así como del Rancho Cortesano de la provincia de Cádiz. En este caso se obtuvo un 97,4% de muestras



Lucía Guillén Cueto



agrupadas en función de su origen geográfico, utilizando la validación cruzada en el análisis discriminante lineal.

Los resultados obtenidos en este estudio, demostraron que la técnica NIRS combinada con herramientas quimiométricas adecuadas, puede considerarse un método rápido y fiable para la detección de miel adulterada con jarabe de maíz de alta fructosa, así como para establecer criterios para garantizar la autenticidad de la miel.



2. English summary

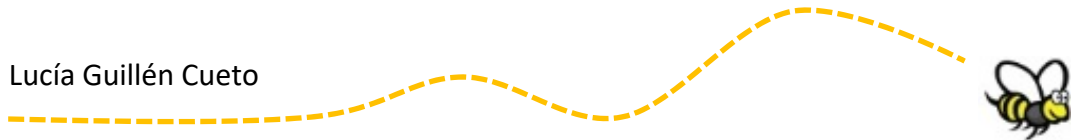
Honey is a natural food product produced by bees from flower nectar. Since ancient times, honey has been used as both a food product and a natural medical remedy due to its high nutritional value and health properties. Honey is a rich source of carbohydrates and phenolic compounds; they are responsible for a large number of biologic effects being a natural antioxidant. Honey is a pure product and the additions of other substances are not allowed. Its quality is determined according to its botanical and geographical origin. The creation of Designation of Origin in honey and high quality products are the reasons for its high cost compared to other commonly used sweeteners making it liable to be adulterated. Nowadays, honey is considered one of the ten most adulterated products in market together with other foodstuff such as olive oil, dairy products, fruit juices,... Adulteration of foodstuff, which involves the premeditated addition of a food ingredient, can be a very attractive and lucrative activity. This practice is fraudulent and it can affect consumer's health. Honey adulteration consists in the addition of refined sugars, water, enzymes, food coloring, etc.

For this reason, it's necessary to develop analytical methodologies to demonstrate the authenticity of the products we consume. In this study, near infrared spectroscopy (NIRS) combined with chemometric techniques has been used for the detection of adulterated honey as well as to discriminate and classify honey samples according to their origin.

For this purpose, different honey samples from Granada Protected Designation of Origin (P.D.O.) have been adulterated by adding high fructose corn syrup at different percentages (0 %-100%). Linear discriminant analysis (LDA) was developed and a classification of 100% was obtained. Moreover, partial least squares regression (PLS) was used in order to predict the level of honey adulteration. Cross validation was employed in an effort to improve the discrimination results. The best prediction model used 10 factors with a high correlation coefficient close to 1. On the other hand, to discriminate honey according to their origin, honey samples from Granada Protected Designation of Origin and from "*El Rancho Cortesano*" in Cadiz, have been analyzed. In this case, LDA showed an accuracy of 97.4% using cross validation to classify according to their geographic origin.

The obtained results showed that NIRS technique combined with suitable chemometric tools can be used as a rapid detection of honey adulteration with high fructose corn syrup as well as to establish criteria to guarantee the authenticity of honey.







3. INTRODUCCIÓN

3.1. Historia y aspectos generales

La miel es un producto natural consumido por el hombre desde hace miles de años (1). Así lo muestran algunas pinturas rupestres encontradas en la Cueva de la Araña en Bicorp (Valencia), donde se puede apreciar la silueta de un hombre subiendo por unas lianas para recolectar la miel (Figura 1). Estas pinturas que datan del año 7000 a. C., confirman que ya en esa época el hombre conocía los beneficios de este alimento. En un principio, se pensaba que los primeros pobladores sólo utilizaban la cera de las abejas con fines medicinales,



Figura 1. – Pinturas en la Cueva de la Araña

para impermeabilizar recipientes o hacer cosméticos. Sin embargo, estudios recientes sobre la huella química que ha dejado la cera en vasijas y otros utensilios de cocina encontrados en yacimientos arqueológicos de Turquía, parecen indicar que también utilizaban la miel, y sitúan el origen de la apicultura junto con el inicio de la agricultura en el Neolítico hace 9000 años (2).

La miel ha sido utilizada a lo largo de la historia con distintos fines, como alimento, edulcorante, remedio medicinal, cosmético... A pesar del tiempo y la aparición de nuevos productos, la miel sigue siendo un alimento muy consumido debido a sus propiedades nutricionales y terapéuticas (3). La miel es el principal producto obtenido de la apicultura, una práctica dedicada a la crianza de las abejas con el objetivo de obtener y consumir los productos elaborados o recolectados por estos insectos (1). El polen, el propóleo y la jalea real son algunos de los productos elaborados por las abejas que poseen al igual que la miel, propiedades beneficiosas para la salud (4). Entre los subproductos derivados de la apicultura, se encontrarían la cera, el hidromiel, la tintura de propóleos y algunos jabones y cremas (5).

La miel es producida por las abejas (mayoritariamente por la *Apis mellifera*) a partir del néctar de las flores (Figura 2). Las abejas recogen tal elevada cantidad de este néctar, que, además de utilizarlo para su alimentación, lo almacenan. Este excedente es extraído por el apicultor y, posteriormente, consumido por los humanos (6). El néctar es una solución de azúcares y otras sustancias con la cual las abejas fabrican la miel. Según el tipo de miel, tanto los azúcares como las distintas sustancias que la componen (sales minerales, vitaminas, proteínas...), varían según su origen (5).



Figura 2.- Abejas en el panal





3.2. Composición y beneficios

La miel es un producto natural de aspecto viscoso y sabor muy dulce (7). Además de enzimas, aminoácidos, ácidos orgánicos, carotenoides, vitaminas, minerales, y sustancias aromáticas, contiene principalmente hidratos de carbono. La miel es rica en compuestos fenólicos responsables de gran cantidad de efectos biológicos, actuando como un antioxidante natural (8). Así mismo, posee propiedades antibacterianas y antivirales, es un sedante natural y ayuda en los procesos de cicatrización (9). Se compone principalmente de agua (17-20%), hidratos de carbono (75-80%) y proteínas (0,3%). La fructosa es el hidrato predominante con un 38%, seguido de la glucosa con un 31%, y por último la maltosa y sacarosa (1).

La miel es muy comercializada en todo el mundo consumido solo o como ingrediente adicional en una gran variedad de productos. Por todos los beneficios que aporta la miel, no es de extrañar su elevado porcentaje de producción anual, por ejemplo entre los años 2005 y 2010 se produjeron alrededor de 1,5 billones de kg de miel (10).

3.3. Regulación y Denominación de Origen

Actualmente, la calidad y la autenticidad de los alimentos juega un papel muy importante en todo el mundo (11). Además, la miel es uno de los pocos agentes edulcorantes que pueden usar los humanos sin procesar y que posee beneficios medicinales. Por ello, de acuerdo con la regulación de la Unión Europea, al *Codex Alimentarius of the Food*, la Organización de las Naciones unidas y otros estándares internacionales, “la miel es un producto puro, al cual no está permitida la adición de cualquier otra sustancia” (12).

En España, las normas de calidad relativas a la miel están reflejadas en el Boletín Oficial del Estado (*Real Decreto 1049/2003*), donde se indica la calidad, parámetros físico-químicos y condiciones que debe cumplir la miel para que pueda ser comercializada (3). Este decreto establece que: “cuando se comercialice la miel como tal, o cuando se utilice en un producto cualquiera destinado al consumo humano, no se le podrá añadir ningún ingrediente alimentario, incluidos los aditivos alimentarios, ni ninguna otra sustancia aparte de miel, y debe estar exenta, en la medida de lo posible, de materias orgánicas e inorgánicas ajenas a su composición” (13). En este mismo decreto, se establece que, si las mieles provienen de varios países de la Comunidad Europea (CE) o de países fuera de ésta, tendrá que aparecer en el etiquetado la indicación: «mezcla de mieles originarias de la CE» o «mezcla de mieles no originarias de la CE». Por tanto, no se puede garantizar que las mieles que no proceden de la Unión Europea posean la calidad y autenticidad exigida.





Para asegurar la procedencia de los alimentos, existen las llamadas Denominaciones de Origen (D.O.), definidas como “el nombre de un lugar determinado, el cual sirve para designar un producto alimenticio que es originario exclusivamente de dicha región, que posee las características de esa zona geográfica y cuya producción tiene lugar en ese mismo territorio”. En España también se encuentran las Indicaciones Geográficas Protegidas (IGP), cuya definición es muy parecida a la anterior, pero, a diferencia de ésta, la producción no tiene porqué llevarse a cabo en su totalidad en la zona geográfica en la que se encuentre (14).

En España existen cuatro D.O. para la miel (Miel de Tenerife, Miel de Granada, Miel de la Alcarria y Miel Villuercas-Ibores) y una IGP (Miel de Galicia). Ambas se rigen por el *Reglamento 510/2006 sobre la protección de las indicaciones geográficas y de las denominaciones de origen de los productos agrícolas y alimenticios*. Actualmente, la única D.O. en Andalucía es la Miel de Granada, sin embargo, existen otras sociedades dedicadas a la apicultura y a la comercialización de la miel con calidad certificada, como es el caso la Sociedad Cooperativa Andaluza “Campo de la Miel” que comercializa la miel de la sierra y montes de la provincia de Cádiz bajo la marca “Rancho Cortesano”(15).

3.3.1. Miel de Granada

Desde hace siglos, la apicultura en Granada es una actividad de gran importancia debido a la flora aromática tan rica que posee en gran parte de la provincia, a su clima y su orografía. Además, gran parte de la apicultura granadina se realiza en áreas protegidas como son el Parque Nacional de Sierra Nevada, los Parques Naturales de la Sierra de Baza, Sierra de Huétor, Sierra de Castril y Sierras de Tejeda, Alhama y Almijara, lo que aporta un valor añadido a su miel. Actualmente en Granada existen alrededor de 50.000 colmenas distribuidas a lo largo de todas estas áreas protegidas. Las ventajas que ofrece esta región frente a otras zonas donde también se practica la apicultura, le permitió a Granada comenzar su andadura como Denominación de Origen Protegida en 2002 (16). La D.O. de Granada ofrece una gran variedad de mieles en función de su origen botánico, estas se pueden visualizar en la Figura 3.



Figura 3.- Miel según el origen botánico de la DO de Granada





3.4. Autenticidad y adulteración de miel

La creación de D.O. y productos de elevada calidad, con el fin de asegurar un negocio justo y proteger a los consumidores, requiere de procesos de autenticación para evitar posibles fraudes y la comercialización de productos que no tienen el origen o la calidad esperada por el consumidor (3).

La adulteración de alimentos que consiste en la adición de una sustancia ajena a su composición natural o eliminación de alguna de las especies químicas que contiene, es uno de los problemas más importantes en la alimentación actual, ya que las empresas buscan el beneficio económico pero sin tener en cuenta que esto, en ocasiones, puede perjudicar seriamente la salud de los consumidores. Son muchos los alimentos susceptibles a estas adulteraciones. Así según un estudio realizado por el *National Center for Biotechnology Information (NCBI)* sobre alimentos adulterados, la miel se encuentra en la séptima posición dentro de los productos más susceptibles a ser adulterados junto con aceites, pescados, zumos, cereales y productos lácteos, entre otros (Figura 4).



Figura 4. – Productos con mayor porcentaje de adulteración

España es el país europeo que produce mayor cantidad de miel, con 34.000 toneladas al año. La calidad de este alimento ha provocado que esté muy demandado en otros países de la Unión Europea. Es por ello, que las industrias españolas al no poder abarcar tales cantidades de producción, han tenido que recurrir a la importación de otros países como China, el mayor productor mundial de miel. Por los antecedentes de este país y debido a que es el único que ha aumentado su producción en los últimos años, se sospecha de un incumplimiento en los estándares de calidad exigidos para este producto (12,17,18).

La adulteración de la miel, conlleva un mayor beneficio económico para el que realiza la mala práctica, ya que se vende al mismo precio que una miel pura cuyos costes de producción son más elevados (17). Existen numerosos modos de adulterar la miel, como la adición de agua, azúcares o jarabes de sacarosa (19). Debido a que el componente principal de la miel es el azúcar, la forma de adulteración más común es mediante la adición de endulzantes más





baratos que la miel, como la caña de azúcar, azúcar invertida, jarabe de maltosa o de maíz de alta fructosa, siendo este último uno de los más habituales (20). El jarabe de maíz de alta fructosa (HFCS) apareció en el mercado en los años 70's, convirtiéndose en el endulzante más consumido en América y Europa (10). El motivo por el que este jarabe es uno de los preferidos, se debe en primer lugar, a que es uno de los edulcorantes más rentables económicamente (21), y en segundo lugar, por su composición química ya que es muy similar a la miel haciendo que sea más difícil detectar la adulteración por un método analítico convencional (17). Los porcentajes comunes de adulteración oscilan entre el 20 y el 50% (10,20,22).

3.5. Técnicas de análisis para la autenticación y detección de adulteraciones

El impacto negativo que tiene la falta de autenticidad o adulteración de la miel en productores y consumidores, junto con el hecho de que se trata de una práctica ilegal, ha hecho necesario el estudio y el desarrollo de técnicas fiables y rápidas para la detección de adulterantes y para la autenticación en este tipo de alimento (20). Por esta razón, en los últimos años ha aumentado el número de estudios enfocados en garantizar la autenticidad de las mieles, bien por su origen botánico y/o geográfico o bien por su calidad (8,11,23–27). Para detectar la adición de agua en miel, solo es necesario medir sus propiedades dieléctricas (19), sin embargo, la detección de edulcorantes no es tan fácil, ya que no es posible realizar un análisis simple del azúcar por ser el componente mayoritario de la miel y por lo tanto, poseer las mismas propiedades físicas (28). Es por ello, que en los últimos años los estudios de investigación han tendido a centrarse en técnicas de análisis instrumental (22). Son muchas las técnicas que se han ido proponiendo a lo largo de los últimos años para la detección de edulcorantes en la miel. Para la identificación de jarabes de caña de azúcar o HFCS, se han hecho estudios del residuo microscópico, verificando con la medida de la relación isotópica $^{13}C/^{12}C$ de miel y su proteína (29,30). Para detectar jarabes de maíz ricos en fructosa, se ha empleado la cromatografía de gases, identificando la presencia de oligosacáridos ajenos a la miel (3)(31). Algunos estudios han utilizado la resonancia magnética nuclear (RMN) para obtener espectros de mieles adulteradas y sin adulterar realizando posteriormente una comparación entre ambos (32) .

La validez de estos métodos ha sido probada en numerosas investigaciones, sin embargo son técnicas que consumen demasiado tiempo, necesitan pretratamiento de la muestra, son destructivas, requieren de un alto conocimiento de la técnica y algunas son muy caras, por lo tanto, no son asequibles para laboratorios de análisis rutinarios. Por esta razón, en los últimos años, ha habido una mayor tendencia a desarrollar métodos analíticos, no destructivos y





económicos, que sean rápidos y sencillos de usar (33), como los basados en técnicas espectroscópicas (34). Estas técnicas con un tratamiento de datos adecuado son capaces de identificar miel adulterada de manera no destructiva (33). Así por ejemplo, la espectroscopía de infrarrojo medio (MIR), en particular la espectroscopía por transformada de Fourier (FTIR), ha sido una técnica ampliamente utilizada para la identificación y autenticación de materiales, debido a su rapidez, robustez y precisión (35). Esta técnica, posee una excelente selectividad y se puede emplear como un método de “huella dactilar” (35,36), al igual que la espectroscopía de infrarrojo cercano (NIRS) que será usada para el presente estudio, y que se trata también de una técnica rápida, altamente precisa, fácil de usar y económica de la que se hablará a continuación en más detalle (10).

3.5.1. Espectroscopía de infrarrojo cercano (NIRS)

La técnica espectroscópica de infrarrojo cercano (NIRS) ha sido ampliamente utilizada en muchos campos (industrias farmacéuticas, químicas, alimenticias, etc.) para el análisis rutinario o incluso monitorización en línea (10). Además, esta técnica ha servido en gran cantidad de investigaciones para la identificación de adulterantes en distintos alimentos como, por ejemplo, para determinar la adición de aceite de girasol en aceite de oliva, ácido cítrico y tartárico en zumo de naranja, manzana en purés de fresa, azúcar y jarabe de maíz en sirope de arce, etc. (34,37,38)

La técnica NIRS comprende las longitudes de onda entre 750 y 2600 nm del espectro electromagnético. Esta espectroscopía se conoce también como espectroscopía de vibración, ya que nos proporciona información sobre la absorción de energía de los grupos funcionales de las moléculas, por las vibraciones que provoca en éstas (34). En la miel por ejemplo, se obtendrán espectros debido a la absorción de energía de los diferentes grupos funcionales que se encuentran en la glucosa y fructosa, como son por ejemplo el C-O y el C-OH (3,10,12,17,20,23,28). Un espectrofotómetro NIR básico consta de (39): (1) Una fuente de radiación que genera un haz de luz que irradia a la muestra, (2) un selector de longitudes de onda que según el dispositivo puede variar, (3) un compartimento de la muestra adaptado al estado físico de la muestra y (4) un detector.

El gran uso de esta técnica, se debe a la serie de ventajas que presenta ya que permite realizar tanto análisis cuantitativos como no cuantitativos, las muestras necesitan una mínima o nula preparación, no es destructiva, no genera residuos y, como ya hemos mencionado anteriormente, es una técnica muy rápida, que en pocos segundos proporciona el resultado





(34). Además, NIRS combinado con técnicas quimiométricas ha resultado ser muy efectivo para determinar de manera cualitativa y cuantitativa la calidad de la miel (20).

3.6. Técnicas quimiométricas

El avance de las técnicas analíticas, las cuales cada día nos proporcionan mayor cantidad de información en muy poco tiempo, ha hecho necesario el desarrollo de técnicas estadísticas y matemáticas que ayuden a convertir esa inmensidad de datos en información útil e interpretable (40). Normalmente en cualquier estudio, se desea determinar de manera individual una o más variables de interés, pero como se ha mencionado anteriormente, el problema surge cuando el número de variables obtenidas con las técnicas de análisis (NIRS, MIR, ICP-MS etc.) es muy grande dificultando su interpretación. Es por ello necesario el uso de técnicas de análisis multivariable (40) que permitan transformar las distintas señales analíticas o datos en información química útil para así poder llevar a cabo una respuesta adecuada ante un problema analítico. Así surge el término quimiometría que se puede definir como la disciplina química que utiliza la matemática, la estadística y la lógica para proporcionar información relevante de los análisis químicos (41). La quimiometría se ha convertido en una parte fundamental de la química analítica, ya que sirve tanto para realizar un diseño de experimentos, como para desarrollar modelos de discriminación, de predicción... y así extraer información útil, que permita la toma de una decisión final. Aunque la mayoría de los métodos quimiométricos pueden ser aplicados a casi cualquier tipo de análisis y señal de un instrumento, se requiere de conocimiento exhaustivo de las distintas herramientas de análisis de datos para poder aplicar el método adecuado en cada situación. Entre las técnicas más habituales en estudios de caracterización o discriminación de muestras se encuentran: el análisis de clústers jerárquico (HCA), el análisis de componentes principales (PCA), el análisis discriminante lineal (LDA) y la regresión parcial por mínimos cuadrados (PLS) (40)

3.6.1 Análisis de clústeres jerárquico (HCA)

El análisis de clústeres jerárquico o HCA, tiene por objetivo agrupar las muestras para lograr la máxima homogeneidad dentro de un grupo y la mayor diferencia entre grupos distintos. Es una técnica no supervisada, donde no se tiene conocimiento de la existencia de grupos a priori, por lo que se trata de una técnica exploratoria que configura grupos usando las variables estudiadas como factor respuesta. Una de las formas más habitual de representar el resultado de este análisis es mediante una gráfica llamada dendograma. Son varios los estudios donde se ha utilizado la técnica NIRS combinada con HCA para determinar miel adulterada (27,42).





3.6.2 Análisis de componentes principales (PCA)

El análisis de componentes principales de sus siglas en inglés (PCA), es una de las técnicas quimiométricas más utilizada ya que permite la reducción de variables y una visualización efectiva de los datos. Se trata de una técnica exploratoria (o no supervisada), ya que no se conoce o se ignora la presencia de categorías. La metodología se basa en encontrar una relación matemática entre las variables estudiadas para que estas puedan ser relacionadas. Así surgen las llamadas “componentes principales” (PCs), que son entidades matemáticas que modelan la información original. Son muchos los estudios en los que se ha usado la técnica NIRS en combinación con PCA para determinar adulteraciones (10,12,24,28,42,43).

3.6.3 Análisis discriminante lineal (LDA)

El análisis discriminante lineal o LDA, a diferencia de la PCA es una técnica supervisada, ya que en este caso, las muestras pertenecen a distintas categorías o grupos que pueden ser conocidas o supuestas y que son establecidos a priori. El LDA se construye a partir de un conjunto de calibración y en base a ello se crean unas funciones discriminantes. Las funciones discriminantes que se obtienen pueden ser usadas para reducir la dimensionalidad de los datos como paso previo a una clasificación. Esta clasificación se realiza asignando a cada grupo una categoría (variable dependiente) y discriminando mediante variables independientes (continuas). Al igual que para la PCA, son muchos los estudios encontrados en la bibliografía donde se combina la técnica NIRS y el LDA (12,20,22,24,33,43–45).

3.6.4. Regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS)

Es un método de regresión multivariado en el cual se combina el análisis de componentes principales y la regresión múltiple lineal. Se trata de una técnica de predicción alternativa que resulta especialmente interesante cuando las variables predictoras están muy correlacionadas. En la literatura científica, se ha utilizado el PLS combinado con otras técnicas para la detección de adulterantes (10,17,20,22,23,28,43–46).





4. OBJETIVOS

La miel es un alimento natural producido por las abejas a partir del néctar de las flores, a la cual no está permitida la adición de ninguna sustancia. La miel se utiliza desde hace años para la alimentación y como remedio natural ya que posee gran cantidad de propiedades beneficiosas para la salud y un alto valor nutricional. Debido a esto, el precio de la miel es bastante superior al de otros edulcorantes, como por ejemplo, el jarabe de maíz de alta fructosa (HFCS). Es por ello, que la miel es susceptible de ser adulterada con este tipo de endulzantes de costes más bajos con el objetivo de aumentar el beneficio económico. Además, la creación de D.O. de productos de elevada calidad como la miel, requiere de procesos de autenticación para evitar posibles fraudes y determinar la autenticidad de las muestras de miel (origen geográfico y/o botánico).

Debido al aumento de la demanda de miel y, por ende, al incremento de ellas en los supermercados, se hace necesario el uso de técnicas fiables que sirvan para identificar la autenticación de mieles y la presencia de mieles adulteradas. De este modo, los objetivos específicos del presente trabajo son los siguientes:

- Identificar y discriminar muestras de miel de la D.O. de Granada adulteradas a distintos porcentajes (0-100%) con jarabe de maíz de alta fructosa haciendo uso de la técnica espectroscópica de infrarrojo cercano (NIRS) en combinación con técnicas quimiométricas.
- Desarrollar y validar un modelo de predicción del porcentaje de adulteración con jarabe de maíz de alta fructosa de las mieles de la D.O. Granada haciendo uso de la técnica espectroscópica de infrarrojo cercano (NIRS) en combinación con técnicas quimiométricas.
- Determinar la autenticidad de muestras de miel procedentes de la D.O. de Granada y del Rancho Cortesano de Cádiz mediante el uso de la técnica espectroscópica de infrarrojo cercano (NIRS) en combinación con técnicas quimiométricas.





5. RESULTADOS

5.1. Materiales y métodos

5.1.1. Muestras

5.1.1.1. Mieles

Para el presente estudio, se han empleado un total de 68 muestras de miel de diferente origen geográfico y botánico. En concreto, se ha trabajado con 42 muestras (n=42) procedentes de la Denominación de Origen de Granada (D.O.), donde 33 de ellas eran del tipo “miel multifloral o milflores”, 7 muestras de “miel monofloral de castaño”, 2 muestras de “miel de sierra” y 1 muestra de “miel monofloral de tomillo”.

También se han empleado 16 muestras (n = 16) procedentes del Rancho Cortesano en Cádiz, de las cuales 14 muestras eran del tipo “miel multifloral o milflores”, 1 muestra de “miel monofloral de azahar” y 1 muestra de “miel monofloral de madroño”.

Adicionalmente, se han usado 6 muestras (n=6) de mieles de milflores adquiridas en supermercados locales, no procedentes de la Unión Europea (UE) (Figura 5) cuyas marcas fueron: Aliada, Supersol, Auchan, Granja San Francisco, Carrefour y Abedul.



Figura 5.- Mieles procedentes de supermercados españoles

Las muestras fueron nombradas mediante el código AA_B_CC, donde:

- AA: Variedad de flor: MF (milflores), CA (castaño), SI (sierra), TO (tomillo), MA (madroño) y AZ (azahar)
- B: Porcentaje de adulteración: de 0 a 100
- CC: Lugar de origen: GR (Granada) y R.C. (Rancho Cortesano)





5.1.1.2. Adulterante

Se ha utilizado como adulterante jarabe de maíz de alta fructosa (HFCS) proporcionado por la empresa Cargill S.L.U. de Martorell (Barcelona) producida el 3 de Febrero de 2017. Este jarabe posee un 81% de sustancia seca, del cual un 8,5% corresponde a fructosa.

5.1.2. Procedimiento de adulteración

Para estudiar la capacidad de la técnica NIRS tanto en la detección de miel adulterada con sirope HFCS como el porcentaje de adulteración, fue necesario llevar a cabo la adulteración de una serie de mieles a distintos niveles. Dado que el tipo de miel más habitual y mayoritaria es la del tipo “miel de milflores”, ésta fue seleccionada para los estudios de adulteración. Con el objetivo de abarcar la mayor heterogeneidad posible, se preparó una matriz madre que consistió en una mezcla de mieles de las 33 muestras del tipo milflores proporcionada por la D.O. de Granada. Para ello, se pesó un total de 22 g de cada una de estas mieles y se adicionaron poco a poco con el fin de obtener una mezcla lo más homogénea posible. A partir de esta matriz madre se prepararon un total de 11 niveles de adulteraciones (0%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% y 100%) usando jarabe de maíz de alta fructosa como adulterante. En la Figura 6, se puede observar el aspecto que presenta la miel adulterada a los distintos porcentajes. Para cada adulteración, se prepararon 50 g de muestra, donde la relación miel/sirope variaba en función del porcentaje de adulteración. Todas las muestras adulteradas fueron preparadas por duplicado.



Figura 6.- Mieles de milflores adulteradas de 0 a 100% (de izquierda a derecha)

Adicionalmente, se prepararon unas muestras adulteradas a porcentajes de adulteración diferentes a los anteriores, 5%, 15%, 25% y 45%, que fueron utilizadas para la validación externa del método desarrollado.

Todas las muestras de miel se mantuvieron en una cámara a 30 °C durante al menos 24 horas antes de ser analizadas para asegurar que la temperatura de todas las muestras fuese la misma en el momento del análisis.





5.1.3. Espectroscopía de infrarrojo cercano (NIRS)

Todas las muestras de mieles fueron analizadas mediante la técnica de espectroscopía de infrarrojo cercano o NIRS. Para ello, se utilizó un espectrómetro FOSS XDS Rapid Content™ Analyzer con la tecnología XDS (FOSS Analytical, Hilleroed, Dinamarca) (Fig. 7). Este equipo posee un analizador con un solo haz y una resolución espectral de 2 nm. Todas las muestras fueron analizadas en el rango de 400 a 2500 nm. Para la adquisición de datos se empleó el programa informático ISIScan™ Routine Analysis Software.



Figura 7.- Equipo de espectroscopía de Infrarrojo Cercano

Antes de comenzar el análisis de las muestras, se realizó previamente la medida del blanco, para ello se realizó la medida de una cubeta vacía con el fin de obtener la intensidad de la radiación incidente en la misma. A continuación, se procedió a medir la intensidad de la radiación absorbida de cada una de las muestras. Las condiciones de medida propuestas fueron 2 barridos/s y una resolución de 4 nm. Todas las muestras fueron analizadas por duplicado.

5.1.4. Análisis de datos

Debido a la gran cantidad de datos obtenidos tras las medidas y con el objetivo de estudiar la potencialidad de la técnica NIRS en la detección del nivel de adulteración en las mieles, fue necesario el uso de técnicas quimiométricas tanto no supervisadas o exploratorias (análisis de clúster jerárquico o HCA, análisis por componentes principales o PCA), como supervisadas (análisis discriminante lineal o LDA). Además, también se llevó a cabo una regresión parcial por mínimos cuadrados (PLS) con el objetivo de desarrollar un modelo de predicción del nivel de adulteración en las mieles. Para la aplicación de estas técnicas fue necesaria la utilización de programas estadísticos como el IBM SPSS Statistics 22 (Armonk, NY) y el Statgraphics Centurion XVI (Warrenton, VA).





Una vez analizadas las diferentes muestras de miel, los resultados fueron organizados en una matriz de datos $D_{m \times n}$ donde m es el número de variables (longitudes de ondas) y n el número de muestras para su posterior tratamiento. Para el estudio de la detección del nivel de adulteración con sirope de maíz de alta fructosa se obtuvo una matriz $D_{247 \times 22}$, mientras que para el estudio de autenticación de las mieles en función de su origen geográfico se obtuvo una matriz $D_{247 \times 114}$.

5.2. Resultados y discusión

5.2.1. Estudio de la adulteración en mieles

En primer lugar, se llevó a cabo el análisis de todas las muestras de miel adulteradas con el sirope de maíz de alta fructosa (HFCS) a los distintos niveles (del 0 al 100%) mediante espectroscopía de infrarrojo cercano (NIRS). En la Figura 8, se pueden observar los espectros medios obtenidos al representar la absorbancia frente a la longitud de onda (en el rango de 400 a 2500 nm) de todas las muestras de miel a los distintos porcentajes de adulteración, incluyendo una muestra de miel sin adulterar (0%) y otra adulterada (100%) que se trata de una muestra únicamente de sirope.

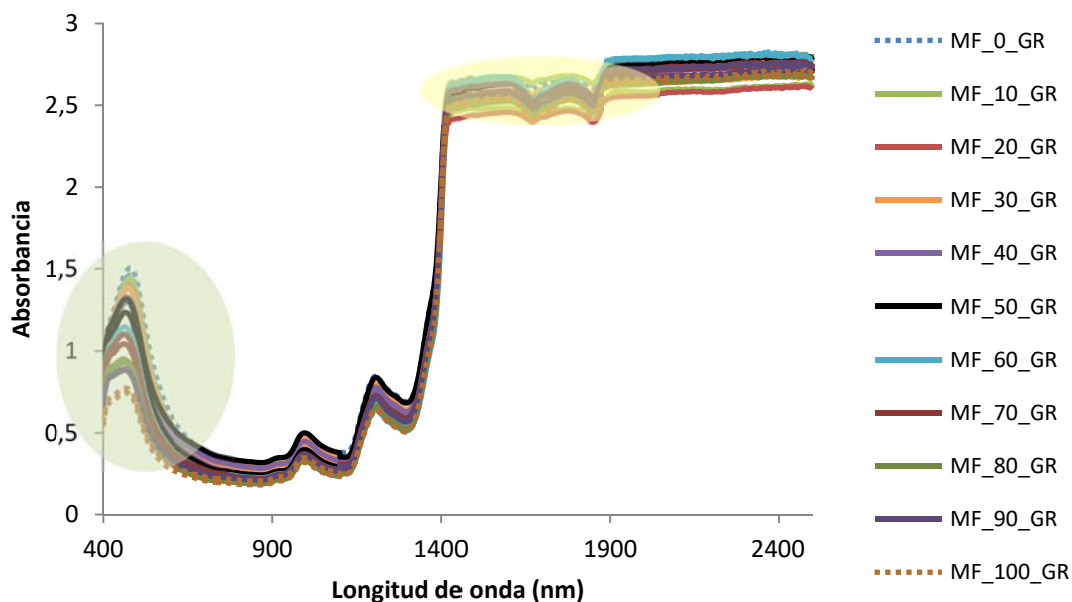


Figura 8.- Espectros NIRS de las mieles adulteradas del 0 al 100% con HFCS (n=22)

Se puede apreciar a simple vista como en algunas zonas del espectro (400-600 nm y 1600-1850 nm) existen diferencias en la intensidad de señal en función del porcentaje de adulteración. Se observa por ejemplo, como al ir añadiendo una mayor cantidad de HFCS, es decir a mayores porcentajes de adulteración, disminuyen los valores de absorbancia en la zona





del espectro visible (400-600 nm), ya que esta zona puede asociarse al color ámbar-amarillo de la miel, y este se ve disminuido debido al tono amarillo pálido que presenta el HFCS.

Aunque parece haber cierta variabilidad de las mieles en función de su grado de adulteración, no se puede identificar ni discriminar entre los distintos porcentajes de adulteración en función de los espectros NIRS mediante la observación a simple vista de los espectros. Es por ello que, se requiere del uso de técnicas quimiométricas que permitan obtener un modelo para la discriminación y predicción de las muestras de miel en función de su grado de adulteración.

5.2.1.1. Análisis de Clúster Jerárquico (HCA)

Con el objetivo de estudiar si existe alguna tendencia en las muestras a agruparse en función del porcentaje de adulteración, se realizó en primer lugar un HCA. Para este análisis, se utilizó toda la información espectral del NIRS (400-2500 nm) de todas las muestras adulteradas ($n=22$), obteniendo así una matriz de datos $D_{247 \times 22}$. Se usó como método de agrupamiento el *método de Ward* y como distancia la *distancia euclidiana al cuadrado*. El resultado de este análisis se representa de forma gráfica en el dendograma de la Figura 9. Como puede observarse, existen dos grandes grupos, un Clúster A, donde se encuentran incluidas todas las mieles adulteradas a mayor porcentaje (70%-100%) y un Clúster B, con aquellas que poseen una adulteración menor (0%-60%). Dentro de cada clúster se puede observar cómo en general, las muestras con adulteraciones más próximas, tienden a agruparse a una distancia menor.

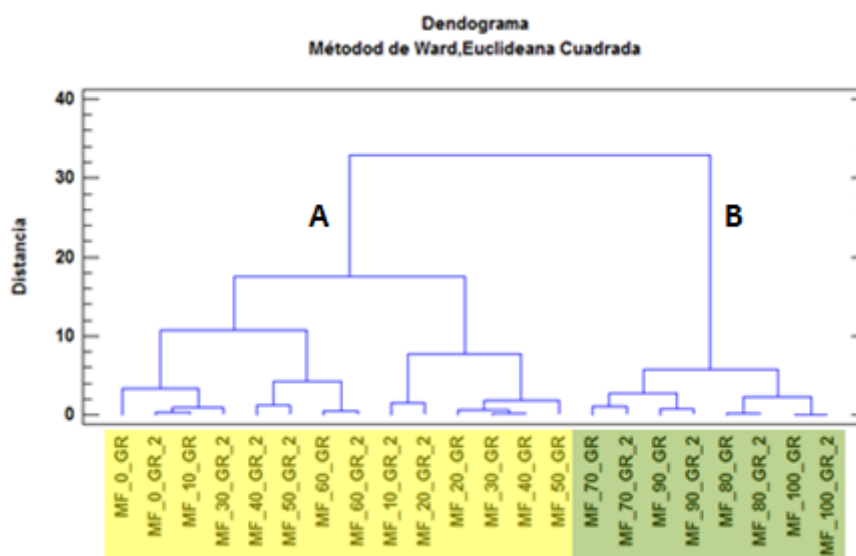


Figura 9.- Dendograma resultante del HCA usando los espectros NIRS de todas las muestras de miel adulteradas del 0 al 100% ($n=22$)





Los resultados de este análisis exploratorio, nos indican que existe una tendencia de las muestras a agruparse en función de si la miel está muy o poco adulterada utilizando la información del NIRS, sin embargo, no nos permiten una clasificación perfecta de las muestras en función de su porcentaje de adulteración. Es por esta razón que se procedió a aplicar un análisis de componentes principales (PCA).

5.2.1.2. Análisis de Componentes Principales (PCA)

En base a la tendencia observada de las muestras de miel a agruparse en función de la adulteración, se realizó un PCA utilizando nuevamente la matriz de datos $D_{247 \times 22}$ con el objeto de reducir el número de variables y obtener una clasificación de las muestras según su porcentaje de adulteración. En la Tabla 1 se representan los resultados obtenidos en este análisis. Como criterio de selección, se extrajeron aquellas PCs cuyo autovalor era mayor o igual a 1. Se observa como con las tres primeras componentes principales (PC1, PC2 y PC3) se explica cerca del 97% de la varianza total acumulada y con las primeras 5 PCs más del 99%.

| Componente | Autovalores iniciales | | |
|------------|-----------------------|---------------|-------------|
| | Total | % de varianza | % acumulado |
| 1 | 141,02 | 57,09 | 57,09 |
| 2 | 88,67 | 35,90 | 92,99 |
| 3 | 9,16 | 3,71 | 96,70 |
| 4 | 5,13 | 2,08 | 98,78 |
| 5 | 1,53 | 0,62 | 99,40 |

Tabla 1.- Resultados del análisis de componentes principales (PCA)

Con el objetivo de visualizar la distribución de las muestras en función de las PCs, se representaron las puntuaciones (score plot) de todas las muestras de miel al enfrentar las 3 primeras PCs (Figura 10).



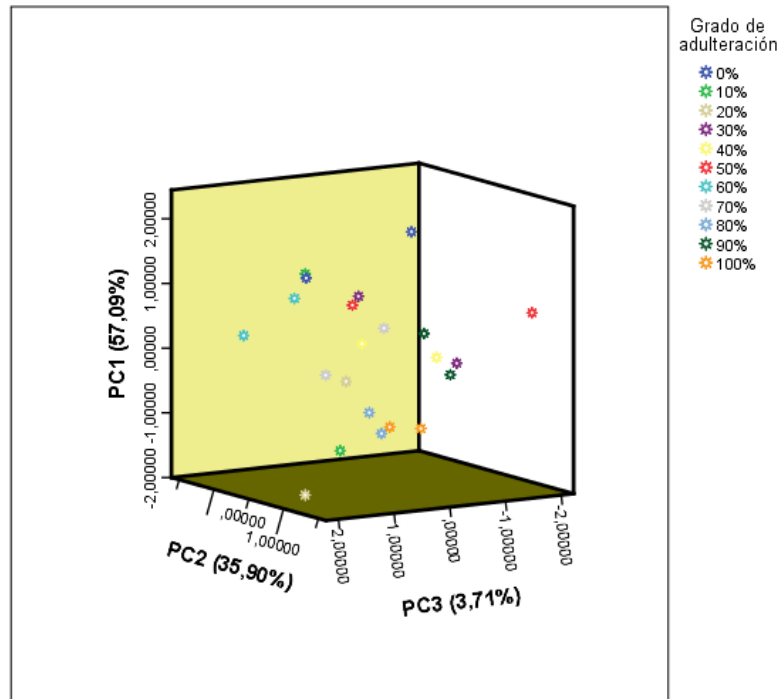


Figura 10.- Representación gráfica de las puntuaciones con respecto a PC1, PC2 y PC3 (n=22)

Se observa en la gráfica como la PC1 está en parte relacionada con el porcentaje de adulteración, ya que por lo general valores mayores en la PC1 se corresponden con un grado de adulteración menor y viceversa. Sin embargo, al igual que ocurrió con el análisis de clúster, no proporciona una clasificación total de las muestras de miel en función de su grado de adulteración. No obstante, se representaron los pesos (*loadings*) de las tres primeras PCs, para ver qué zonas del espectro tienen mayor peso en cada componente (Figura 11). En cuanto a la PC1 que parecía estar relacionada con el porcentaje de adulteración, se observa como la mayoría de las longitudes de onda presentan valores de pesos altos (cerca de 0,70), lo que indica que no existe ninguna zona con mayor influencia que otras sobre esta PC1. Es por ello, que se decidió aplicar una herramienta quimiométrica supervisada como es el análisis discriminante lineal o LDA.



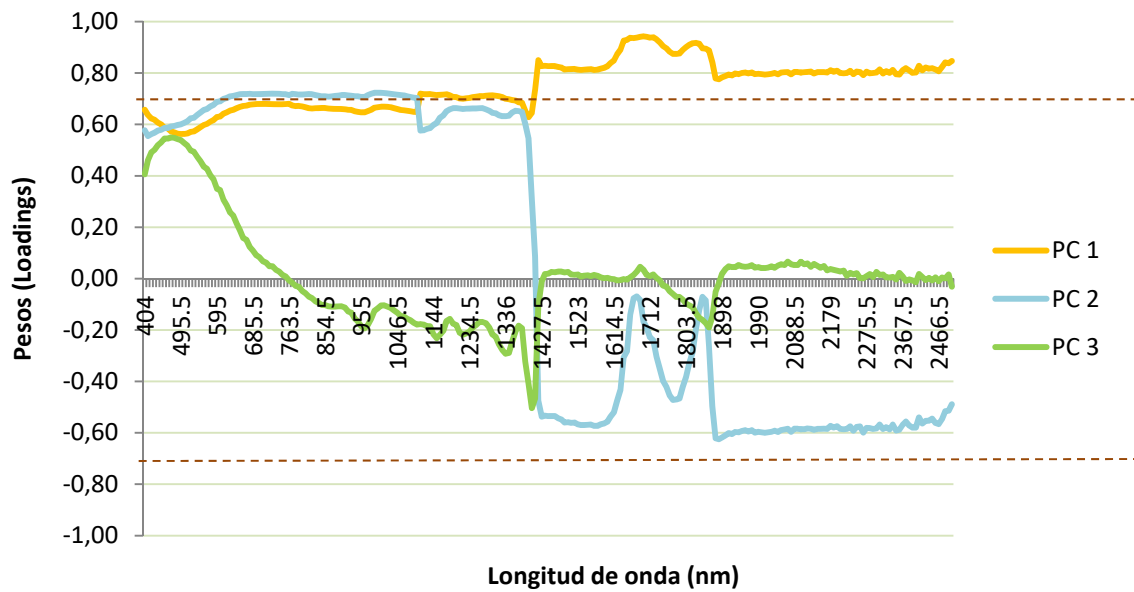


Figura 11.- Representación de los pesos de la PC1, PC2 y PC3

5.2.1.3. Análisis Discriminante Lineal (LDA)

En base a la tendencia observada de las muestras de miel a agruparse en función del nivel de adulteración usando la información del NIRS, pero no habiendo sido posible obtener una clasificación total con los análisis exploratorios anteriores, se procedió a realizar un análisis discriminante lineal (LDA). Al igual que en los casos anteriores, se aplicó sobre toda la matriz de datos $D_{247 \times 22}$. Para llevar a cabo este análisis, se asignó una categoría distinta a cada porcentaje de adulteración, (obteniendo un total de 11 categorías) con el objetivo de conocer si se pueden clasificar las muestras en función del grado de adulteración y cuáles son las señales espectrales que posee mayor importancia para la discriminación de las mismas. Para ello, se realizó un LDA utilizando el método de inclusión por pasos y usando el método de validación cruzada. Las funciones discriminantes obtenidas, permitieron una discriminación perfecta (100%) de todas las muestras de miel en función de su porcentaje de adulteración. En la Tabla 2 se muestran los coeficientes de las funciones discriminantes lineales de Fisher de la clasificación. Como se puede observar, las longitudes de onda seleccionadas en el LDA y que por lo tanto tienen mayor peso en la discriminación de las muestras estudiadas fueron; $\lambda = 411,5$ nm, $\lambda = 444,5$ nm, $\lambda = 472,5$ nm, $\lambda = 1093$ nm y $\lambda = 1462$ nm.





| | Nivel de adulteración (%) | | | | | | | | | | |
|-------|---------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | 0 | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 | 70 | 80 | 90 | 100 |
| 411.5 | 63579,07 | 60847,03 | 63140,00 | 64560,00 | 68979,02 | 71594,00 | 79286,00 | 81546,00 | 81539,00 | 75782,00 | 56844,04 |
| 444.5 | -14269,06 | -17028,00 | -2033,00 | 5935,00 | 17842,00 | 30082,00 | 37154,00 | 36968,00 | 34281,05 | 34649,00 | 33810,00 |
| 472.5 | -14542,00 | -9972,00 | -25964,00 | -34978,00 | -49281,00 | -63302,00 | -75818,08 | -77697,00 | -76697,00 | -74964,00 | -64164,00 |
| 1093 | -29279,00 | -29014,00 | -28658,00 | -27999,00 | -28442,00 | -27745,00 | -28477,00 | -28385,00 | -26840,00 | -23611,00 | -16699,00 |
| 1462 | 775,00 | 499,00 | 1164,00 | 1641,00 | 2271,00 | 2963,00 | 3679,09 | 3833,00 | 3957,00 | 4048,00 | 3635,00 |
| (Cte) | -10642,00 | -10155,09 | -10874,00 | -11426,00 | -13225,00 | -14879,00 | -17542,00 | -17884,00 | -16919,00 | -15061,00 | -9856,00 |

Tabla 2.- Coeficientes de las funciones de clasificación obtenidos en el LDA para los diez niveles de adulteración

En la Figura 12, se representa la distribución de las muestras en relación a las 3 primeras funciones discriminantes FD1, FD2 y FD3.

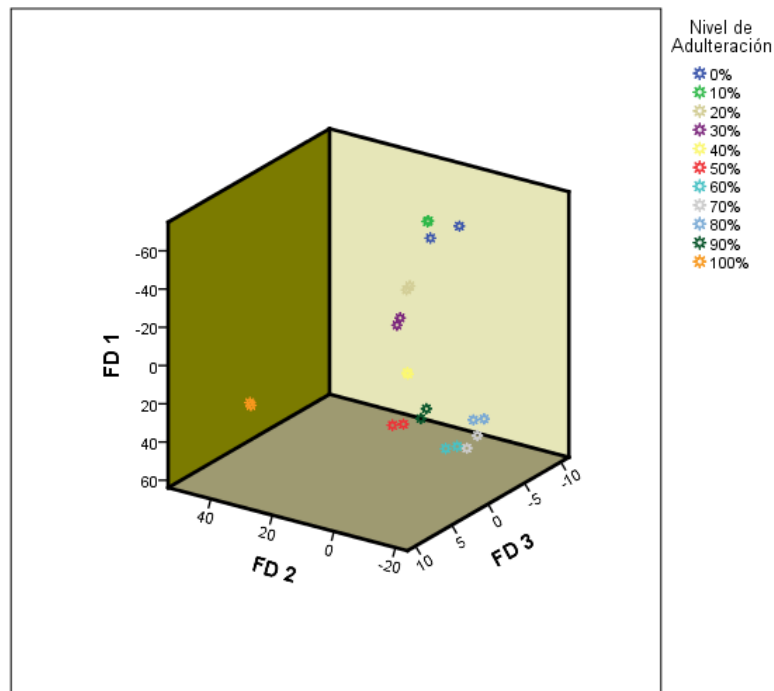


Figura 12.- Representación gráfica de las puntuaciones discriminantes obtenidas en el LDA (n=22)

En base al buen resultado obtenido en la discriminación donde además solo se han utilizado cuatro longitudes de ondas, se decidió realizar una regresión univariante con cada una de las longitudes de onda y usando todas las muestras, con el objetivo de comprobar si la señal de alguna de ellas era suficiente para determinar el nivel de adulteración en la miel. Los resultados de las distintas regresiones se presentan en la Figura 13.



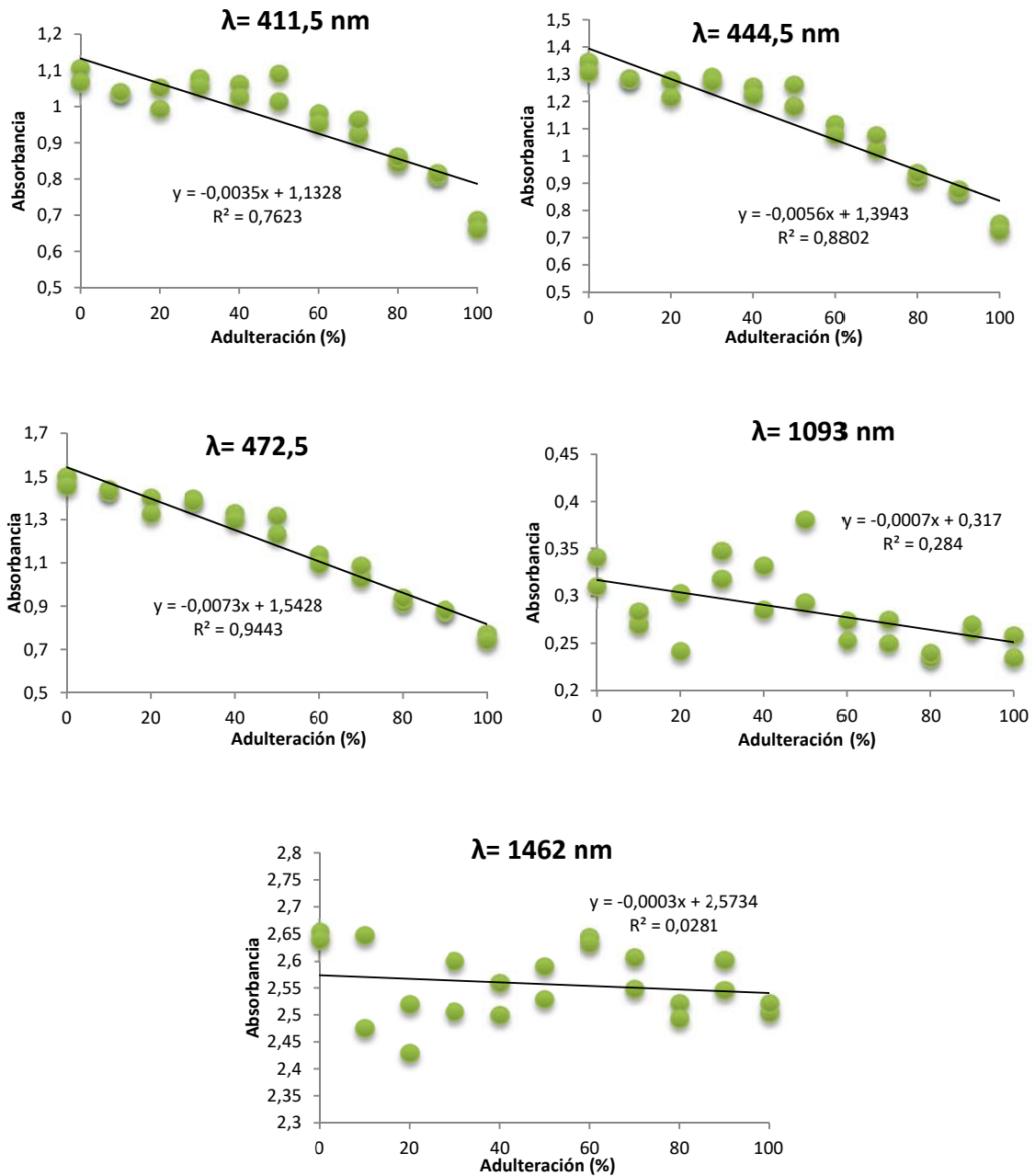


Figura 13.- Rectas de regresión univariante usando las longitudes de onda seleccionadas en el LDA para todas las muestras adulteradas (n=22)

Se observa como la $\lambda = 472,5 \text{ nm}$ posee un coeficiente de correlación, R^2 , mayor de 0,90, lo que indica que esta longitud de onda, tienen una mayor influencia en la discriminación de las muestras en función del nivel de adulteración. Sin embargo, no es suficientemente alto para predecir el nivel de adulteración, esto indica que es necesario el uso de la combinación de las





distintas longitudes de onda. En base a este resultado, y teniendo en cuenta, que un modelo de detección de adulteraciones basado en un modelo multivariante es más difícil de eludir que uno basado en la medida de una única longitud de onda, se procedió a realizar una regresión parcial por mínimos cuadrados.

5.2.1.4. Regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS)

Se realizó una regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS), utilizando todos los datos espectrales de las mieles adulteradas (400-2500 nm) a los distintos porcentajes (0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100%) con el objetivo de desarrollar un modelo que permitiese determinar el porcentaje de sirope de maíz de alta fructosa en mieles adulteradas. Para el desarrollo del modelo se utilizó el método de validación cruzada. Con el uso de 10 componentes se obtuvo un R^2 de 0,999. En la Figura 14 se presentan los resultados obtenidos al representar los valores observados frente a los predichos.

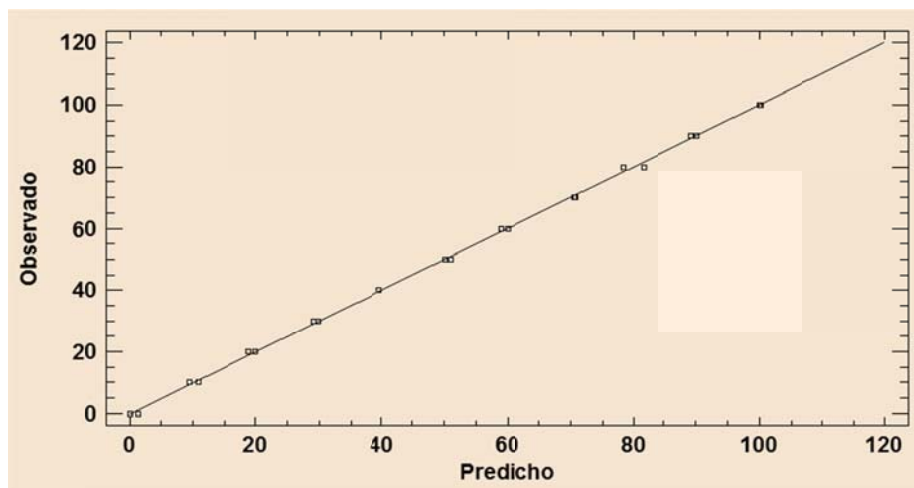


Figura 14.- Rectas de regresión multivariante mediante PLS para todas las muestras adulteradas (n=22)

Adicionalmente, con el fin de realizar una validación externa se prepararon un conjunto de muestras de mieles adulteradas con HFCS a porcentajes no incluidos inicialmente para el desarrollo del modelo (5%, 15%, 25% y 45%) Los resultados de los valores predichos se muestran en la Tabla 3.





| Porcentaje adulteración (%) | Predicción PLS (%) | Error (%) |
|-----------------------------|--------------------|-----------|
| 0 | 0,69 | 0,34* |
| 5 | 5,27 | 5,4 |
| 15 | 14,85 | 1 |
| 25 | 24,31 | 2,76 |
| 45 | 42,63 | 5,27 |

**Se presenta el valor del error absoluto*

Tabla 3.- Valores reales vs Predichos obtenidos en el PLS

Se observa en la Tabla 3, la exactitud del método en la predicción del nivel de adulteración, por lo que se podría confirmar que este modelo es válido para predecir el porcentaje de adulteración con HFCS en mieles del tipo milflores de la D.O. de Granada.

5.2.1.5. Estudio de repetibilidad y precisión intermedia

En vista a los buenos resultados obtenidos, se comprobó si además el método desarrollado es repetible y reproducible utilizando para ello una muestra adulterada al 40 %. Para el estudio de la repetibilidad se analizó dicha muestra nueve veces en un mismo día con la técnica NIRS, y para la precisión intermedia se analizó la misma muestra tres veces en tres días distintos: 3 muestras el primer día, 3 en el segundo otras 3 en el tercero, usando la misma técnica NIRS. Una vez analizado, se calculó el coeficiente de variación (CV) de los datos obtenidos en el estudio de repetibilidad, así como también el CV de los tres días para el estudio de reproducibilidad. Como se muestra en la Tabla 4, en ninguno de los dos casos el CV ha superado el 10%, por lo que se trata de una técnica repetible y reproducible.





| | CV (%) |
|------------------------------|--------|
| Repetibilidad (9) | 3,90 |
| Precisión intermedia (3+3+3) | 3,63 |

Tabla 4.- CV obtenido en el estudio de repetibilidad y precisión intermedia

5.2.1.6. Estudio de la aplicabilidad del método en muestras comerciales

En base a los buenos resultados obtenidos en cuanto a la validez del método de predicción del porcentaje de adulteración, y comprobando además de que se trata de un método preciso se realizó de forma exploratoria y a modo de curiosidad un estudio sobre el “posible” nivel de adulteración de muestras comerciales provenientes de fuera de la Unión Europea. Para ello, se analizaron cinco muestras de mieles comerciales de marca blanca del tipo “milflores” adquiridas en comercios de la zona mediante el modelo desarrollado. Los resultados de este análisis se encuentran en la Tabla 5.

| Mieles comerciales | Predicción PLS (%) |
|----------------------|--------------------|
| Aliada | 11,90 |
| Supersol | 45,55 |
| Auchan | 35,65 |
| Granja San Francisco | 17,56 |
| Carrefour | 11,74 |
| Abedul | 18,12 |

Tabla 5.- Predicción de mieles comerciales mediante PLS

Aunque se observan posibles adulteraciones en las mieles comerciales, no podemos asegurar el resultado ya que hay variables que no se han tenido en cuenta y pueden influir como son: el procesado de la muestra, otros posibles adulterantes que pudieran interferir, influencia de la zona geográfica.... El modelo desarrollado demuestra la potencialidad de la técnica NIRS en combinación con técnicas quimiométricas para detectar adulteraciones. Sin embargo, en este estudio, sólo se ha podido validar para mieles milflores de la D.O. de Granada. Habría que realizar un estudio más exhaustivo, incluyendo mieles de distintas zonas geográficas para introducir mayor heterogeneidad, considerar otros posibles adulterantes, y poder así desarrollar un modelo válido de detección de adulteraciones de miel a mayor escala.





5.2.2. Estudio de autenticación de las mieles en función de su origen

5.2.2.1. Análisis de Clúster Jerárquico (HCA)

Se realizó un segundo estudio, con el objetivo de conocer si la técnica NIRS también proporciona información útil para caracterizar e identificar las muestras en función de su origen geográfico, y poder así demostrar la autenticidad de las mieles de una zona geográfica.

Para ello, se analizaron en el NIRS (en el rango de 400-2500 nm), muestras de miel de distintito origen botánico (milflores, castaño, azahar...) y procedentes de dos zonas geográficas distintas: un total de n=41 muestras de miel de la D.O. de Granada y 16 del R.C. en Cádiz. Se obtuvo por lo tanto una matriz de datos $D_{247 \times 57}$. El hecho de que los grupos no sean homogéneos en número se debe a que no ha sido posible disponer de un número mayor de muestras por parte del Rancho Cortesano de Cádiz.

Se comenzó al igual que en el primer estudio, realizando un análisis exploratorio HCA, utilizando como método de agrupamiento el *método de Ward* y como distancia la *distancia euclidiana al cuadrado*. El resultado del HCA se representa nuevamente de forma gráfica en el dendograma de la Figura 15. En este caso, se observan dos grandes grupos, un Clúster A, que incluye las 41 muestras de miel de la D.O. de Granada junto con un pequeño número de muestras del R.C. (5 de las 16), y un Clúster B que engloba el resto de las muestras del RC (n=11).

Los resultados del HCA, nos indican que existe una tendencia de las muestras a agruparse en función del origen geográfico en base a la información obtenida en el NIRS, sin embargo, de nuevo, no permite una clasificación perfecta de las muestras en función de su origen, por lo que se continuó con un análisis de componentes principales (PCA).



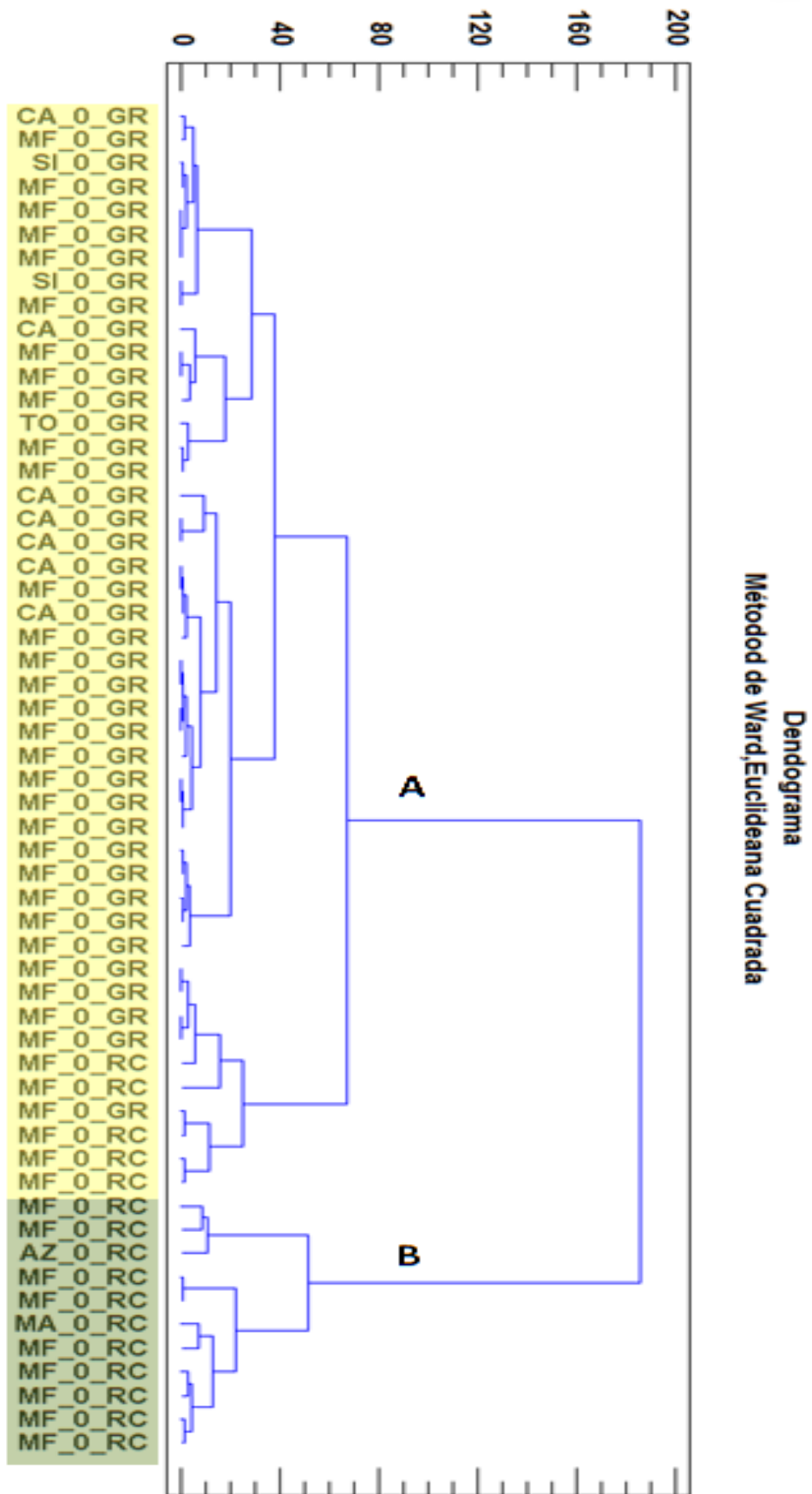


Figura 15.- Dendrograma resultante del HCA usando los espectros medios NIRS de todas las muestras de miel de la DO de Granada y del RC (n=57)





5.2.2.2. Análisis de Componentes Principales (PCA)

El PCA se realizó con el objetivo de estudiar si una reducción de variables permitiría una diferenciación de las muestras de miel en función de su origen geográfico. Por ello, se realizó el PCA utilizando la matriz de datos $D_{247 \times 114}$. En la Tabla 6 se representan los resultados obtenidos en este análisis. Siguiendo el mismo criterio, se extrajeron aquellas PCS cuyo autovalor fuese mayor o igual a 1. Se observa como con las tres primeras componentes principales (PC1, PC2 y PC3) se explica un 95% de la varianza total acumulada y con las primeras 5 PCs el 99%.

| Componente | Autovalores iniciales | | |
|------------|-----------------------|---------------|-------------|
| | Total | % de varianza | % acumulado |
| 1 | 159,00 | 64,00 | 64,00 |
| 2 | 63,00 | 25,00 | 90,00 |
| 3 | 13,00 | 5,00 | 95,00 |
| 4 | 6,00 | 2,00 | 98,00 |
| 5 | 1,00 | 0,00 | 99,00 |

Tabla 6.- Resultados del PCA para clasificar según origen

Como ya se hizo anteriormente, para poder visualizar como se distribuyen las muestras de la D.O. de Granada y del R.C. en función de las PCs, se representaron gráficamente las puntuaciones (scores) de todas las muestras de miel en función de las 3 primeras PCs (Figura 16).

En la gráfica, se puede observar como la PC1 está altamente relacionada con el origen geográfico de la miel, así como también la PC3 muestra algo de influencia en menor medida. Es por ello que se van a representar los pesos de la PC1, PC2 y PC3 (Figura 17) para conocer la influencia de las longitudes de onda dentro de cada componente.



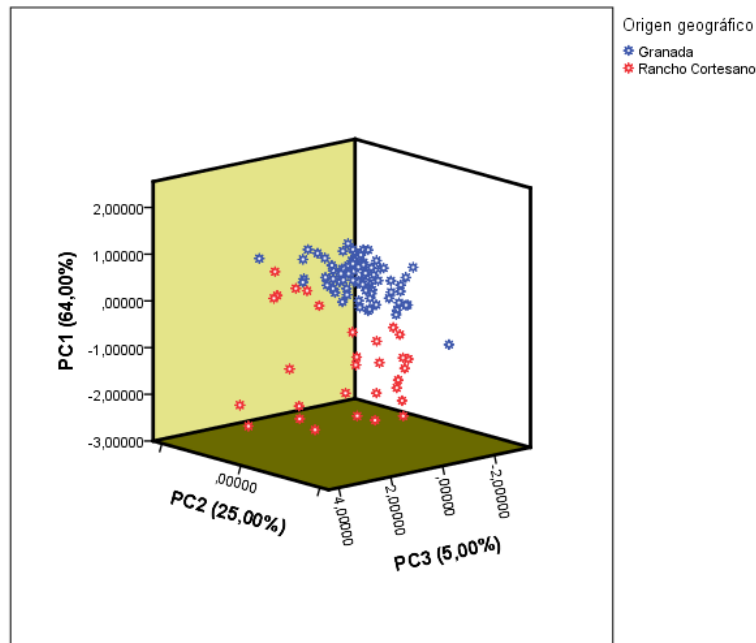


Figura 16.- Representación gráfica de las puntuaciones con respecto a PC1, PC2 y PC3 (n=112)

Como se puede observar, la mayoría de las longitudes de onda presentan un peso mayor de 0.7 (en valor positivo o negativo), indicando de nuevo que no existe una zona del espectro específica que tenga mayor peso para diferenciar las mieles en función de su origen geográfico. En base a estos resultados, se decidió continuar con un análisis discriminante lineal con el fin de obtener una discriminación mayor de las muestras en función de su origen geográfico.

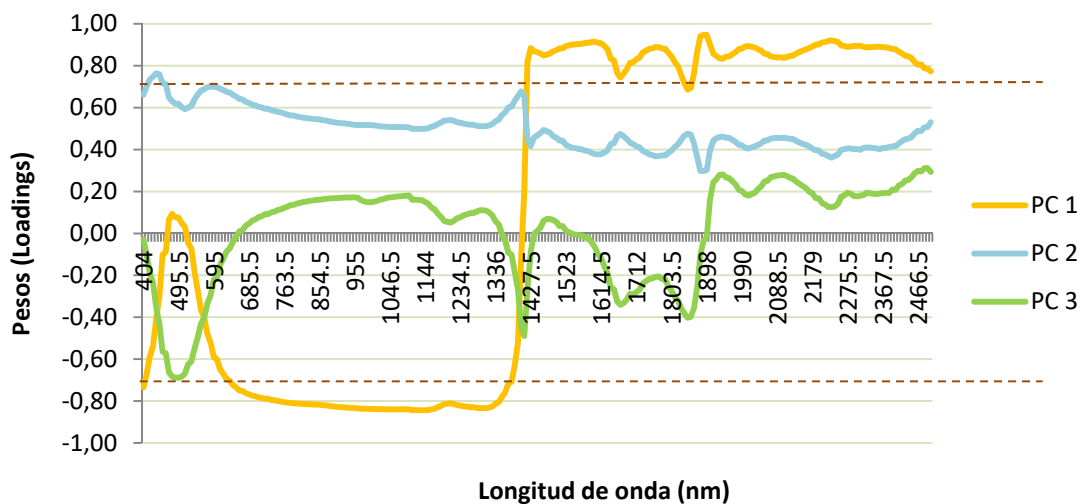


Figura 17.- Representación de los pesos de la PC1, PC2 y PC3





5.2.2.3. Análisis Discriminante Lineal (LDA)

Dada la tendencia existente de las muestras a agruparse en función de su origen geográfico, pero no siendo posible la clasificación total con los análisis realizados anteriormente, se llevó a cabo un análisis discriminante lineal (LDA) utilizando toda la matriz de datos $D_{247 \times 114}$. En este caso, se establecieron dos categorías a priori, una para cada procedencia (Denominación de Origen de Granada y Rancho Cortesano) con el objeto de conocer si las muestras se podían discriminar en función de su origen geográfico. Se realizó un LDA utilizando el *método de independientes* juntas y usando la *validación cruzada*. Las funciones discriminantes obtenidas permitieron una discriminación correcta del 97,4% ($n= 111$). 3 muestras del R.C., fueron clasificadas dentro del grupo de la D.O. de Granada.

En este estudio, las longitudes de onda que tienen mayor peso en la discriminación en base al origen geográfico de las muestras estudiadas fueron: $\lambda=404$ nm, $\lambda=411'5$ nm, $\lambda=444'5$ nm, $\lambda=526$ nm, $\lambda=651$ nm, $\lambda=1408$ nm, $\lambda=1667$ nm y $\lambda=1829$ nm. En la Tabla 7 se pueden visualizar los coeficientes de las funciones discriminantes lineales de Fisher de la clasificación, donde el 0 se refiere a las muestras de miel de la D.O. de Granada y el 1 al R.C.:

| | Origen geográfico | |
|--------------------|-------------------|-----------|
| | D.O. | R.C. |
| 404 | 2265,000 | 1767,015 |
| 411.5 | 15209,053 | 15793,000 |
| 444.5 | -8136,000 | -8224,000 |
| 526 | 1855,000 | 1833,000 |
| 651 | -9465,000 | -9391,000 |
| 1408 | -1134,000 | -1121,000 |
| 1667 | -50,000 | 167,000 |
| 1829 | 1395,000 | 1136,000 |
| (Constante) | -3290,000 | -3277,000 |

Tabla 7.- Funciones discriminantes para dos grupos de muestras

Este pequeño error del 2.6% puede ser debido a la diferencia en el número de muestras por parte de ambas zonas. Sería interesante poder disponer de mayor número de muestras procedentes de la de la provincia de Cádiz para garantizar con mayor exactitud el método desarrollado. No obstante, el NIRS junto con la aplicación de técnicas quimiométricas adecuadas como LDA ha demostrado ser una metodología útil para garantizar la autenticidad de la miel en función su origen geográfico. Sería interesante ampliar este estudio considerando un mayor número de zonas geográficas, para poder aplicar esta metodología a mayor escala.





6. CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos, se pueden establecer las siguientes conclusiones:

- La espectroscopía de infrarrojo cercano (NIRS) en combinación con técnicas quimiométricas apropiadas han demostrado ser una metodología muy eficaz para determinar tanto la adulteración con distintos niveles de jarabe de maíz de alta fructosa (HFCS), como para garantizar la autenticidad de las mieles en función de su origen geográfico.
- La técnica NIRS combinada con técnicas quimiométricas no supervisadas como el análisis de clúster jerárquico (HCA) y el análisis de componentes principales (PCA), han permitido observar una tendencia de las muestras a agruparse en función de un mayor o menor porcentaje de adulteración pero no una diferenciación total de las mismas.
- La técnica NIRS en combinación de una técnica quimiométrica, en este caso supervisada, como es el análisis discriminante lineal (LDA), ha sido un método muy eficaz para determinar adulteración en mieles ya que permite una discriminación total (100%) de todas las muestras en función de su grado de adulteración.
- Se ha desarrollado y validado un modelo de predicción del porcentaje de adulteración con HFCS basado en la regresión de mínimos cuadrados parciales, PLS, (R^2 de 0,999) y la información de la técnica NIRS.
- La técnica NIRS en combinación con técnicas quimiométricas exploratorias, HCA y el PCA, ha permitido la diferenciación, aunque no total, de las muestras en función del origen geográfico.
- La técnica NIRS en combinación con LDA, ha permitido una discriminación del 97,4% de las mieles en función de su origen geográfico demostrando ser un método útil para garantizar la autenticidad de las mieles.





7. BIBLIOGRAFÍA

- [1] U. Siedentopp, «La miel: producto alimenticio y medicinal eficaz contra la inflamación, la tos y la ronquera», *Rev. Int. Acupunt.*, vol. 4, n.º 1, pp. 48-51, 2010.
- [2] M. D. Mélanie Roffet-Salque, Martine Regert, Richard P. Evershed, Alan K. Outram, Lucy J. E. Cramp, Orestes Decavallas, Julie Dunne, Pascale Gerbault, Simona Mileto, Sigrid Mirabaud, Mirva Pääkkönen, Jessica Smyth, Lucija Šoberl, Helen L. Whelton, Alfonso Alday, «Widespread exploitation of the honeybee by early Neolithic farmers», *Nature*, vol. 527, pp. 226-230, 2015.
- [3] Marisol Juan Borrás, *Herramientas Analíticas en la Clasificación de Mieles en Base a Criterios de Calidad e Inocuidad*. 2016.
- [4] P. Zoccali, A. Malacrinò, O. Campolo, F. Laudani, G. M. Algeri, G. Giunti, C. P. Strano, G. Benelli, y V. Palmeri, «A novel GIS-based approach to assess beekeeping suitability of Mediterranean lands», *Saudi J. Biol. Sci.*, vol. 24, n.º 5, pp. 1045-1050, 2017.
- [5] FAO, «La miel - Un alimento popular». [En línea]. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/008/y5110s/y5110s05.htm>.
- [6] C. Manuel y E. González, «Apicultura y producción de miel».
- [7] X. Xue, «Recent advancements in detecting sugar-based adulterants in honey», *Trends Anal. Chem.*, 2016.
- [8] P. Missio, C. Gauche, L. V. Gonzaga, A. Carolina, y O. Costa, «Honey: Chemical composition, stability and authenticity», *Food Chem.*, vol. 196, pp. 309-323, 2016.
- [9] S. Ayoub, S. A. Al-asiri, y A. Latief, «Role of honey in modern medicine», *Saudi J. Biol. Sci.*, vol. 24, n.º 5, pp. 975-978, 2017.
- [10] G. Bázár, R. Romvári, A. Szabó, T. Somogyi, V. Éles, y R. Tsenkova, «NIR detection of honey adulteration reveals differences in water spectral pattern», *Food Chem.*, vol. 194, pp. 873-880, 2016.
- [11] M. Chudzinska y D. Baralkiewicz, «Application of ICP-MS method of determination of 15 elements in honey with chemometric approach for the verification of their authenticity», *Food Chem. Toxicol.*, vol. 49, n.º 11, pp. 2741-2749, 2011.
- [12] X. Zhu, S. Li, Y. Shan, Z. Zhang, G. Li, D. Su, y F. Liu, «Detection of adulterants such as sweeteners materials in honey using near-infrared spectroscopy and chemometrics», *J. Food Eng.*, vol. 101, n.º 1, pp. 92-97, 2010.
- [13] Ministerio de la Presidencia, *REAL DECRETO 1049/2003*,. 2003, pp. 30181-30183.
- [14] CONSEJO DE LA UNIÓN EUROPEA, *REGLAMENTO (CE) No 510/2006 DEL CONSEJO de 20 de marzo de 2006 sobre la protección de las indicaciones geográficas y de las*





- denominaciones de origen de los productos agrícolas y alimenticios*, n.º 10. 2006, pp. 12-25.
- [15] «Miel de Rancho Cortesano». [En línea]. Disponible en: <http://www.ranchocortesano.net>.
- [16] Consejo Regulador Denominación de Origen Protegida Miel de Granada, «<http://www.mieldegranada.com>», 2011. .
- [17] L. Chen, X. Xue, Z. Ye, J. Zhou, F. Chen, y J. Zhao, «Determination of Chinese honey adulterated with high fructose corn syrup by near infrared spectroscopy», *Food Chem.*, vol. 128, n.º 4, pp. 1110-1114, 2011.
- [18] V. Maté, «La amarga invasión de la miel china», *El País*, 2016. [En línea]. Disponible en: <http://economia.elpais.com>.
- [19] W. Guo, X. Zhu, Y. Liu, y H. Zhuang, «Sugar and water contents of honey with dielectric property sensing», *J. Food Eng.*, vol. 97, n.º 2, pp. 275-281, 2010.
- [20] S. Li, X. Zhang, Y. Shan, D. Su, Q. Ma, R. Wen, y J. Li, «Qualitative and quantitative detection of honey adulterated with high-fructose corn syrup and maltose syrup by using near-infrared spectroscopy», *Food Chem.*, vol. 218, pp. 231-236, 2017.
- [21] G. A. Bray, S. J. Nielsen, y B. M. Popkin, «Consumption of high-fructose corn syrup in beverages may play a role in the epidemic of obesity 1 , 2», 2004.
- [22] S. Amiry, M. Esmaili, y M. Alizadeh, «Classification of adulterated honeys by multivariate analysis», *Food Chem.*, vol. 224, pp. 390-397, 2017.
- [23] A. Guelpa, F. Marini, R. Slabbert, y M. Manley, «Verification of authenticity and fraud detection in South African honey using NIR spectroscopy», *Food Control*, vol. 73, pp. 1388-1396, 2017.
- [24] C. Frausto-reyes, R. Casillas-peñuelas, J. L. Quintanar-stephano, y E. Macías-lópez, «Spectroscopy Spectroscopic study of honey from *Apis mellifera* from different regions in Mexico», *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 178, pp. 212-217, 2017.
- [25] M. Oroian y R. Sorina, «Honey authentication based on physicochemical parameters and phenolic compounds», *Comput. Electron. Agric.*, vol. 138, pp. 148-156, 2017.
- [26] P. Silva, J. Freitas, C. L. Silva, R. Perestrelo, F. M. Nunes, y S. C, «Establishment of authenticity and typicality of sugarcane honey based on volatile profile and multivariate analysis Jos e», vol. 73, pp. 1176-1188, 2017.
- [27] S. Gok, M. Severcan, E. Goormaghtigh, I. Kandemir, y F. Severcan, «Differentiation of Anatolian honey samples from different botanical origins by ATR-FTIR spectroscopy using multivariate analysis», *Food Chem.*, vol. 170, pp. 234-240, 2015.





- [28] C. Kumaravelu y A. Gopal, «Detection and Quantification of Adulteration in Honey through Near Infrared Spectroscopy», *Int. J. Food Prop.*, vol. 18, n.º 9, pp. 1930-1935, 2014.
- [29] A. Simsek, M. Bilsel, y A. C. Goren, «C / 12 C pattern of honey from Turkey and determination of adulteration in commercially available honey samples using EA-IRMS», *Food Chem.*, vol. 130, n.º 4, pp. 1115-1121, 2012.
- [30] M. Tosun, «Detection of adulteration in honey samples added various sugar syrups with 13 C / 12 C isotope ratio analysis method», *Food Chem.*, vol. 138, n.º 2-3, pp. 1629-1632, 2013.
- [31] M. L. Sanz y I. Martí, «Journal of Food Composition and Analysis Detection of adulterations of honey with high fructose syrups from inulin by GC analysis», vol. 23, pp. 273-276, 2010.
- [32] D. Bertelli, L. Bortolotti, M. Lolli, G. Papotti, G. Serra, y M. Plessi, «Detection of Honey Adulteration by Sugar Syrups Using Nuclear Magnetic Resonance», pp. 8495-8501, 2010.
- [33] M. Piotr, M. Ku, y V. Ruth, «Adulteration using using Hyperspectral Hyperspectral Imaging», pp. 316-319, 2016.
- [34] S. Zossi, R. M. Ruiz, y N. Sorol, «Espectroscopia por infrarrojo cercano (NIRS). Su aplicación en análisis de jugos de caña de azúcar», vol. 87, n.º 1, pp. 1-6, 2010.
- [35] C. Das, S. Chakraborty, K. Acharya, y N. Kumar, «FT-MIR supported Electrical Impedance Spectroscopy based study of sugar adulterated honeys from different floral origin», *Talanta*, vol. 171, n.º May, pp. 327-334, 2017.
- [36] S. Sivakesava y J. Irudayaraj, «A Rapid Spectroscopic Technique for Determining Honey Adulteration with Corn Syrup», *Food Chem.*, vol. 66, n.º 6, pp. 787-792, 2001.
- [37] A. A. C. Hristy, S. K. Asemsumran, D. U. Yiping, y Y. O. Zaki, «The Detection and Quantification of Adulteration in Olive Oil by Near-Infrared Spectroscopy and Chemometrics», vol. 20, n.º June, 2004.
- [38] J. K. N. Ogrinc, I. J. Košir, J. E. Spangenberg, «The application of NMR and MS methods for detection of adulteration of wine, fruit juices, and olive oil.», *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 376, n.º June, pp. 424-430, 2003.
- [39] A. Peguero, «La espectroscopia NIR en la determinación de propiedades físicas y composición química de intermedios de producción y productos acabados.», 2010.
- [40] Antonieta Rios Corripio, «Quimiometría en miel de abeja para la determinación de azúcares y detección de adulteración utilizando espectroscopía infrarroja», 2010.
- [41] Guillermo Ramis, *Quimiometría*. 2001.





- [42] P. Pohl, A. Bielawska-pohl, A. Dzimitrowicz, P. Jamroz, M. Welna, A. Lesniewicz, y A. Szymczycha-madeja, «Recent achievements in element analysis of bee honeys by atomic and mass spectrometry methods», *Trends Anal. Chem.*, vol. 93, pp. 67-77, 2017.
- [43] B. Zábrowská y L. Vorlová, «Adulteration of honey and available methods for detection – a review», *Acta Vet. Brno*, vol. 83, n.º 10, pp. S85-S102, 2015.
- [44] A. J. Siddiqui, S. G. Musharraf, M. I. Choudhary, y A.- Rahman, «Application of analytical methods in authentication and adulteration of honey», *Food Chem.*, 2017.
- [45] L. Wu, B. Du, Y. Vander, L. Chen, L. Zhao, M. Wang, y X. Xue, «Recent advancements in detecting sugar-based adulterants in honey e A challenge», *Trends Anal. Chem.*, vol. 86, pp. 25-38, 2017.
- [46] C. H. Latorre, R. M. P. Crecente, S. G. Martín, y J. B. García, «A fast chemometric procedure based on NIR data for authentication of honey with protected geographical indication», *Food Chem.*, vol. 141, n.º 4, pp. 3559-3565, 2013.





8. APÉNDICES

8.1 Acrónimos

- NIRS.....Espectroscopía de infrarrojo cercano
- CE.....Comunidad Europea
- D.O.....Denominación de Origen
- IGP.....Indicación Geográfica Protegida
- HCFS.....Jarabe de maíz de alta fructosa
- HCA.....Análisis de clúster jerárquico
- PCA.....Análisis de componentes principales
- LDA.....Análisis discriminantes lineal
- PLS.....Regresión de mínimos cuadrados parciales
- CV.....Coeficiente de variación

