



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Desarrollo de una herramienta instrumental de gusto artificial aplicable a bebidas alcohólicas a base de miel de abejas

Martha María Cuenca Quicazán

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ingeniería, Departamento de Ingeniería Química y Ambiental

Bogotá D.C

2014

Desarrollo de una herramienta instrumental de gusto artificial aplicable a bebidas alcohólicas a base de miel de abejas

Martha María Cuenca Quicazán

Tesis presentada como requisito para optar al título de:

Doctorado en Ingeniería

Área Ingeniería Química

Director:

Juan Carlos Serrato Bermúdez, PhD

Línea de Investigación: Bioprocesos

Grupos de Investigación:

Grupo de Aseguramiento de la Calidad de Alimentos y Desarrollo de Nuevos Productos

Grupo de Procesos Químicos y Bioquímicos

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ingeniería, Departamento de Ingeniería Química y Ambiental

Bogotá D.C

2014

A Dios y a la vida, por darme la oportunidad de tener esta experiencia que no sólo me ha aportado aprendizaje profesional sino personal.

A toda mi familia y amigos, quienes me apoyaron incansablemente con su compañía, su paciencia y su cariño.

A mi padre, cuya presencia siempre me ha acompañado en todos los momentos de mi vida.

A mi madre, una mujer que ha sido el ejemplo a seguir y mi inspiración para llevar a cabo este reto académico.

A mi hermano y a Islén, quienes me han hecho sentir apreciada y valorada.

A Marco, la persona que me hace sentir inteligente, sensible y viva desde que nos conocimos.

Agradecimientos

Al Departamento Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Colciencias, por otorgarme el Crédito Condonable de la Convocatoria 511 “Convocatoria Nacional para Estudios de Doctorado en Colombia - Año 2010”, entidad que me permitió la realización del doctorado durante cuatro años. También por la financiación del proyecto “Desarrollo de un modelo productivo de bebidas fermentadas de miel como estrategia para generar valor en el ámbito característico de la apicultura en Colombia” presentado en julio de 2012, proyecto que permitió la contextualización del trabajo de investigación y la consecución de los materiales requeridos para llevar a cabo las fermentaciones.

A la Dirección de Investigación de la Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá (DIB), por la financiación del Proyecto “Desarrollo de una herramienta instrumental para la caracterización de un producto fermentado a partir de miel”, con el cual se dispuso de los materiales necesarios para desarrollar esta tesis, así como por la realización de los trámites necesarios para la realización de la pasantía en Italia.

Al Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos (ICTA) de la Universidad Nacional de Colombia, donde se efectuaron la mayor parte de las actividades experimentales este trabajo de investigación, especialmente a los laboratorios de Análisis Instrumental de Alimentos, Análisis Microbiológico, Vegetales y a la Planta Piloto de Vegetales. A todo el personal docente, técnico y de estudiantes, especialmente: a los profesores Anibal Herrera, Consuelo Díaz, Héctor Suárez, Marta Quicazán, María Soledad Hernández y Carlos Novoa; a los técnicos Héctor Monsalve, Wilson Castro, Marta Esguerra, Gregorio Medina, Dora Uribe, Paola Hernández, Ivonne González, Nazly Pulido, Amaury Blanco, Alexander Erazo, Yuly Correa.

Al Departamento de Ingeniería Química y Ambiental de la Facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional de Colombia, por permitirme desarrollar las actividades académicas requeridas para la obtención de este título, especialmente al profesor Juan Carlos Serrato, director de este trabajo, a los profesores Mario Velásquez, Alvaro Orjuela, Rubén Godoy,

Rodrigo Jiménez y Francisco Boada por sus aportes en la discusión de la propuesta. A Ricardo Cortés, técnico del Laboratorio de Electroquímica y Catálisis, a los estudiantes del programa de Maestría y Doctorado en Ingeniería Química. A los estudiantes de Ingeniería Química Alexander Torres, Alejandro Palacios, Mario Dávila, William Mora y Andrea Nieto, por su invaluable colaboración en el laboratorio.

A la Libre Universidad de Bolzano (Italia), especialmente a la Facultad de Ciencia y Tecnología y al Profesor Matteo Scampicchio, por recibirme para la realización de la pasantía durante seis meses, período en el cual pude aprender las diferentes técnicas electroquímicas empleadas en este trabajo, así como la utilización de otras metodologías disponibles en sus laboratorios.

Al Centro de Investigación de Agricultura y Silvicultura Laimburg, de la Provincia de Bolzano (Italia), especialmente al Investigador Flavio Ciesa, por permitirme efectuar diferentes ensayos de fermentación en sus instalaciones, así como utilizar el PTR-MS.

Al Departamento de Ciencia para los Alimentos, la Nutrición y el Ambiente (Defens) de la Universidad de Milán (Italia), especialmente a los profesores Saverio Mannino y Stella Cossio, así como los investigadores Simona Benedetti, Susanna Buratti y Carlos Fuenmayor por permitirme la realización de ensayos de fermentación en sus instalaciones y la utilización de nariz y lengua electrónicas comerciales.

A la Universidad de Pamplona (Colombia), especialmente al profesor Cristhian Durán, por la asesoría en el tema de análisis de señales y manejo de los datos obtenidos.

Resumen

Se llevó a cabo el monitoreo a lo largo del tiempo de la fermentación de hidromiel a 25°C, usando *Saccharomyces cerevisiae* subsp. *bayanus* como agente fermentador, miel diluida, polen, frutos rojos, diferentes hierbas aromáticas y especias, partiendo de mostos con 24°Brix, los cuales se pasteurizaron previamente. Se desarrolló una herramienta de gusto artificial con un potencióstato de cuatro canales, combinación de sensores de platino y grafito modificados con sulfato de cobre, aplicación de voltametría cíclica y onda cuadrada. Las señales obtenidas se correlacionaron con otras variables obtenidas: pH, acidez total, contenido de azúcares, productividad, conversión, contenido de etanol, actividad antioxidante, perfil de compuestos volátiles, espectro FTIR-ATR, nariz electrónica, lengua electrónica comercial y panel sensorial entrenado. Mediante análisis de componentes principales y correlaciones lineales por mínimos cuadrados se pudo establecer que la herramienta permite el monitoreo del proceso fermentativo, así como también la clasificación de diferentes hidromieles.

Palabras clave: Fermentación, hidromiel, gusto artificial, alcohol, rendimiento, electroquímica, voltametría

Abstract

A mead fermentation monitoring was done at 25°C by using *Saccharomyces cerevisiae* subsp. *bayanus*, diluted honey, pollen, red fruits, various herbs and spices, starting from pasteurized musts with 24 °Brix. An artificial taste system was developed with a four channel potentiostat, platinum and modified with copper sulfate graphite sensors, and the application of cyclic and square wave voltammetry. The signals obtained were correlated with other variables obtained: pH, total acidity, sugar content, productivity, conversion, ethanol content, antioxidant activity, profile of volatile compounds, FTIR-ATR spectrum, electronic nose and electronic tongue and a trained sensory panel. By using principal component analysis and least squares linear correlations it was established that the tool allows monitoring the fermentation process as well as the classification of different meads.

Keywords: fermentation, mead, artificial taste tool, ethanol, yield, electrochemistry, voltammetry

Contenido

Agradecimientos.....	V
Resumen.....	VII
Lista de figuras.....	XIII
Lista de tablas.....	XXII
Introducción.....	1
1. Antecedentes.....	5
1.1 Cadena productiva de las abejas y la apicultura (CPPA) en Colombia.....	6
1.2 Miel.....	7
1.3 Hidromiel.....	8
1.4 Análisis y seguimiento de fermentaciones etanólicas.....	10
1.5 Análisis sensorial.....	11
1.5.1 Definición.....	12
1.5.2 Tipos de pruebas.....	12
Pruebas afectivas.....	12
Pruebas Analíticas.....	12
1.5.3 Análisis sensorial a través de instrumentos.....	14
1.6 Lengua electrónica.....	16
1.6.1 Antecedentes de la lengua electrónica.....	17
1.6.2 Principios de la lengua electrónica.....	17
Sensores Potenciométricos.....	20
Sensores Voltamétricos.....	20
Otros sensores	21
1.6.3 Técnicas electroquímicas analíticas.....	22
Voltametría cíclica.....	22
Voltametría de Onda Cuadrada.....	25
1.6.4 Aplicaciones en diferentes industrias.....	26
2. Materiales y Métodos.....	29
2.1 Materias primas.....	29
2.1.1 Miel.....	29
2.1.2 Agua.....	29
2.1.3 Polen.....	30
2.1.4 Levadura.....	30
2.1.5 Azúcar	30

2.1.6	Hierbas, frutas y especias.....	30
2.1.7	Hidromieles comerciales.....	30
2.1.8	Reactivos y soluciones.....	32
2.2	Condiciones de fermentación.....	32
2.3	Análisis fisicoquímicos.....	33
2.3.1	Porcentaje de sólidos solubles.....	33
2.3.2	Acidez Total.....	33
2.3.3	Actividad Antioxidante.....	33
	Método de Folin-Ciocalteu.....	34
	Método FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power).....	35
	Método ABTS.....	35
2.3.4	Determinación de azúcares y alcoholes.....	36
2.3.5	Determinación del perfil de compuestos volátiles usando PTR-MS.....	36
2.3.6	Evaluación de diferentes muestras mediante FTIR-ATR.....	39
2.3.7	Espectroscopía UV-Visible.....	42
2.4	Análisis sensorial.....	43
2.5	Sistema de gusto artificial.....	43
2.5.1	Determinaciones electroquímicas realizadas (Italia).....	45
2.5.2	Determinaciones electroquímicas realizadas con la herramienta de gusto artificial (Colombia)	47
	Pruebas iniciales en el sistema electroquímico.....	48
	Selección y utilización de sensores.....	48
	Ensayos con ferricianuro de potasio.....	49
	Ensayos con soluciones modelo.....	50
	Ensayos preliminares con muestras reales.....	52
	Caracterización de algunas bebidas alcohólicas utilizando voltametría cíclica y sensores comerciales.....	52
	Evaluación de algunos ácidos orgánicos.....	53
2.5.3	Modificación de sensores de grafito con cobre.....	54
	Ensayos preliminares para electrodo de grafito modificado con cobre.....	55
	Validación de las mediciones obtenidas con el electrodo de grafito modificado con cobre.....	56
2.5.4	Modificación de sensores de grafito con nanotubos de carbono.....	56
	Ensayos iniciales.....	57
	Curva de calibración para el ácido cafeico.....	59
	Validación de la curva de calibración para el ácido cafeico.....	59
	Evaluación del comportamiento de la señal con la variación de pH para ácido cafeico.....	60
	Evaluación de muestras reales.....	60
2.5.5	Determinaciones con nariz electrónica y lengua electrónica comerciales.....	61
	Nariz electrónica.....	61
	Lengua electrónica comercial.....	61
3.	Selección de sensores.....	65
3.1	Pruebas iniciales en el sistema electroquímico.....	65
3.2	Ensayos con ferricianuro de potasio y diferentes soluciones búfer.....	67
3.2.1	Ensayos con nitrato de potasio.....	67
3.2.2	Ensayos con cloruro de potasio como búfer.....	70
3.3	Ensayos del sistema electroquímico con soluciones modelo.....	72
3.4	Ensayos preliminares con muestras reales.....	76
3.4.1	Utilización de cloruro de potasio como búfer.....	76

3.4.2	Ensayos sin uso de búfer.....	78
3.5	Electrodo de platino.....	82
3.6	Modificación de sensores.....	86
3.6.1	Modificación de sensores de grafito con cobre.....	87
	Ensayos preliminares para electrodo de carbón vítreo modificado con cobre.....	87
	Ensayos preliminares para electrodo de grafito (AC1W4R1) modificado con cobre.....	88
	Validación de las mediciones obtenidas con el electrodo de electrodo de grafito (AC1W4R1) modificado con cobre.....	90
3.6.2	Modificación de sensores de grafito con nanotubos de carbono.....	93
	Ensayos preliminares para electrodo de carbón vítreo modificado con nanotubos de carbono.....	94
	Evaluación del comportamiento de la señal con la variación de pH para ácido cafeico utilizando electrodo de carbón vítreo modificado con nanotubos de carbono.....	95
	Evaluación de muestras reales utilizando electrodo de carbón vítreo modificado con nanotubos de carbono.....	96
	Ensayos con el electrodo de grafito (AC1W4R1) modificado con nanotubos de carbono.....	99
	Evaluación de curva de calibración para el ácido cafeico con electrodo de grafito (AC1W4R1) modificado con nanotubos de carbono.....	100
	Validación de la utilización de la curva de calibración para el ácido cafeico.....	102
3.6.3	Aplicación de diferentes sensores en el seguimiento de la fermentación alcohólica.....	104
	Determinaciones fisicoquímicas.....	106
4.	Monitoreo de fermentaciones.....	111
4.1	Fermentaciones con diferentes tipos de materias primas.....	111
4.1.1	Fermentaciones con evaluación de fuente de carbono, con insumos colombianos.....	112
4.1.2	Fermentaciones con evaluación de fuente de carbono, con insumos italianos.....	116
4.2	Fermentaciones con adición de especias y diferentes insumos.....	121
4.2.1	Fermentaciones con insumos colombianos.....	121
4.2.2	Fermentaciones con insumos italianos.....	128
	Ensayos realizados en Italia.....	128
	Ensayos realizados en Colombia.....	136
4.2.3	Defectos en las fermentaciones con adición de especias e insumos italianos.....	145
4.3	Fermentaciones con adición de hierbas y especias.....	150
4.4	Fermentaciones con frutos rojos, diferentes fuentes de nitrógeno y diferentes tratamientos de higienización.....	157
4.5	Fermentación de hidromiel tradicional y determinación de perfil con lengua y nariz electrónica comerciales.....	163
4.6	Determinación de perfil sensorial de fermentación de hidromiel tradicional.....	169
5.	Evaluación de hidromieles.....	177
5.1	Evaluación de hidromieles obtenidos a lo largo de las diferentes fermentaciones.....	177
5.1.1	Fermentaciones con adición de especias y con diferentes insumos.....	177
	Fermentaciones con insumos colombianos.....	177

	Fermentación con insumos italianos	178
5.1.2	Hidromieles con adición de hierbas y especias.....	179
5.1.3	Hidromieles con adición de frutos rojos, diferentes fuentes de nitrógeno y diferentes tratamientos de higienización.....	180
5.2	Hidromieles comerciales.....	181
5.3	Análisis de componentes principales.....	182
6.	Conclusiones y Recomendaciones.....	187
6.1	Conclusiones.....	187
6.2	Recomendaciones.....	190
	Bibliografía.....	191
A.	Anexo: Información acerca de la miel.....	205
B.	Anexo: Vigilancia Tecnológica	219
C.	Anexo: Información sobre hidromiel	221
D.	Anexo: Aplicaciones de lengua electrónica	239
E.	Anexo: Evaluación cinética sensorial de hidromiel tradicional.....	283
F.	Anexo: Selección y adquisición del sistema de gusto artificial.....	285
G.	Anexo: Resultados de diferentes sensores para soluciones de sustancias puras.....	287

Lista de figuras

Figura 1-1. Señal de excitación potencial-tiempo en un experimento de voltametría cíclica (adaptada de (Wang 2000)).....	23
Figura 1-2. Voltamograma típico para un proceso rédox $O + ne^- \rightarrow R$ (adaptada de (Wang 2000))	24
Figura 1-3. Voltamograma típico para un proceso irreversible (A) y parcialmente reversible (B) (tomada de (Wang 2000))	24
Figura 1-4. Forma de la onda cuadrada en la cual se muestra la amplitud, el paso de altura, el período y el tiempo de retardo (tomada y adaptada de (Wang 2000)).....	26
Figura 1-5. Variación de la corriente contra el voltaje para transferencia de electrones reversible: corriente hacia adelante (A), corriente inversa (B) y corriente neta (C) (tomada y adaptada de (Wang 2000)).....	26
Figura 2-1 Diagrama de proceso de fermentación.....	32
Figura 2-2 Esquema del PTR-MS (Tomado y adaptado de (HelmholtzZentrum 2014))	38
Figura 2-3 Esquema de toma de muestra utilizando el PTR-MS	38
Figura 2-4 Fotografía del sistema PTR-MS marca Ionicon (a) y de las conexiones auxiliares (b), Laimburg, Italia	39
Figura 2-5 Esquema de funcionamiento del FTIR-ATR (Tomado y adaptado de (PerkinElmer 2005)).....	41
Figura 2-6 Fotografía del sistema FTIR ATR marca Bruker (a) y detalle del portamuestra (b), utilizado, Bolzano, Italia.....	42
Figura 2-7 Fotografía del espectrofotómetro marca Agilent con control de temperatura utilizado	43
Figura 2-8 Voltamograma modelo de voltametría cíclica	44

Figura 2-9 Voltamograma modelo de voltametría de onda cuadrada.....	45
Figura 2-10 Diferencia de corriente para voltametría de onda cuadrada.....	45
Figura 2-11 Fotografía sistema electroquímico marca Metrohm, Bolzano, Italia.....	46
Figura 2-12 Esquema de electrodo de carbón vítreo utilizado en el sistema marca Metrohm	46
Figura 2-13 Imagen del sistema empleado para realización de mediciones electroquímicas	47
Figura 2-14 Esquema de nariz electrónica (Tomado y adaptado de (Xu et al. 2014)).....	61
Figura 2-15 Imágenes del Taste Sensing System SA 402 B (Tomado y adaptado de (Laureati et al. 2010))	63
Figura 3-1. Resultados de prueba barrido lineal para todos los canales con el kit para test de funcionamiento.....	66
Figura 3-2. Resultados de prueba de ruido para todos los canales con el kit para test de funcionamiento.....	66
Figura 3-3. Voltametría cíclica de una solución de ferricianuro de potasio con el sensor AC1W4R1 Dw=1 mm (grafito) y nitrato de potasio 0.1 M como búfer.....	68
Figura 3-4. Voltametría cíclica de una solución de ferricianuro de potasio con el sensor AC1W4R1 Dw=2 mm (grafito) y nitrato de potasio 0.1 M como búfer.....	68
Figura 3-5. Voltametría cíclica de una solución de ferricianuro de potasio con el sensor AC1W2R1 (platino) y nitrato de potasio 0.1 M como búfer.....	69
Figura 3-6. Voltametría cíclica de una solución de ferricianuro de potasio con el sensor AC1W1RS (oro) y nitrato de potasio 0.1 M como búfer.....	69
Figura 3-7. Voltametría cíclica de una solución de ferricianuro de potasio con el sensor el sensor AC1W4R1 DW = 2 mm (grafito) y cloruro de potasio 1 M como búfer.....	70
Figura 3-8. Voltametría cíclica de una solución de ferricianuro de potasio con el sensor AC1W2R1 (platino) cloruro de potasio 1 M como búfer.....	71
Figura 3-9. Voltametría cíclica de una solución de ferricianuro de potasio con el sensor AC1W1RS (oro) y cloruro de potasio 1 M como búfer.....	71
Figura 3-10. Voltametría cíclica para solución de glucosa usando diferentes sensores y cloruro de potasio 0.2 M como búfer.....	74
Figura 3-11. Voltametría cíclica para solución de etanol usando diferentes sensores cloruro de potasio 0.2 M como búfer.....	74

Figura 3-12. Voltametría cíclica para solución de glicerol usando diferentes sensores cloruro de potasio 0.2 M como búfer.....	75
Figura 3-13. Voltametría cíclica para solución de ácido acético usando diferentes sensores cloruro de potasio 0.2 M como búfer.....	75
Figura 3-14. Voltametría cíclica de las diferentes muestras analizadas con el sensor AC1W4R1 (grafito).....	76
Figura 3-15. Voltametría cíclica de las diferentes muestras analizadas con el sensor AC1W2R1 (platino).....	77
Figura 3-16. Voltametría cíclica de las diferentes muestras analizadas con el sensor AC1W1RS (oro).....	77
Figura 3-17. Voltametría cíclica para diferentes muestras con el sensor AC1W4R1 (grafito), sin solución búfer	79
Figura 3-18. Voltametría cíclica para diferentes muestras con el sensor AC1W2R1 (platino) sin solución búfer.....	79
Figura 3-19. Voltametría cíclica para diferentes muestras con el sensor AC1W1RS (oro) sin solución búfer.....	80
Figura 3-20. Comportamiento del sensor AC1W2R1 (platino) y diferentes muestras analizadas.....	81
Figura 3-21. Voltametría de onda cuadrada para ácido tartárico, utilizando electrodo AC1W2R1 y ácido perclórico +cloruro de potasio como búfer.....	82
Figura 3-22. Voltametría de onda cuadrada para ácido málico, utilizando electrodo AC1W2R1 y ácido perclórico + cloruro de potasio como búfer.....	83
Figura 3-23. Voltametría de onda cuadrada para ácido cítrico, utilizando electrodo AC1W2R1 y ácido perclórico +cloruro de potasio como búfer.....	83
Figura 3-24. Voltametría de onda cuadrada para ácido acético, utilizando electrodo AC1W2R1 y ácido perclórico + cloruro de potasio como búfer.....	84
Figura 3-25. Voltametría de onda cuadrada para diferentes ácidos utilizando electrodo AC1W2R1 y ácido perclórico +cloruro de potasio como búfer.....	85
Figura 3-26. Voltametría cíclica para diferentes carbohidratos y etanol con electrodo de carbón vítreo modificado con cobre y medio alcalino	87
Figura 3-27. Voltametría de onda cuadrada para diferentes carbohidratos y etanol con electrodo de carbón vítreo modificado con cobre y medio alcalino.....	88

Figura 3-28. Voltametría cíclica para diferentes carbohidratos con electrodo AC1W4R1 modificado con cobre y medio alcalino.....	89
Figura 3-29. Voltametría cíclica para diferentes alcoholes con electrodo AC1W4R1 modificado con cobre y medio alcalino.....	89
Figura 3-30. Voltametría de onda cuadrada para diferentes concentraciones de glucosa utilizando electrodo AC1W4R1 modificado con cobre e hidróxido de sodio como búfer.....	90
Figura 3-31. Voltametría de onda cuadrada para diferentes concentraciones de fructosa utilizando electrodo AC1W4R1 modificado con cobre e hidróxido de sodio como búfer.....	91
Figura 3-32. Voltametría de onda cuadrada para diferentes concentraciones de sacarosa utilizando electrodo AC1W4R1 modificado con cobre e hidróxido de sodio como búfer.....	91
Figura 3-33. Voltametría de onda cuadrada para diferentes concentraciones de glicerol utilizando electrodo AC1W4R1 modificado con cobre e hidróxido de sodio como búfer.....	92
Figura 3-34. Voltametría de onda cuadrada para diferentes concentraciones de etanol utilizando electrodo AC1W4R1 modificado con cobre e hidróxido de sodio como búfer.....	92
Figura 3-35. Voltametría cíclica para soluciones de ácido cafeico con electrodo de carbón vítreo modificado con nanotubos de carbono y búfer de fosfato de potasio, pH 6 + KCl 0.1 M.....	94
Figura 3-36. Variación de la señal obtenida para una solución de ácido cafeico 58.6 μ M, utilizando diferentes soluciones y electrodo de carbón vítreo modificado con nanotubos de carbono.....	96
Figura 3-37. Voltametría de onda cuadrada para diferentes extractos acuosos utilizando electrodo de carbón vítreo modificado con nanotubos de carbono y búfer de fosfatos 0.2 M, pH6 + cloruro de potasio 0.1M.....	97
Figura 3-38. Cambio de corriente contra voltaje para diferentes hidromieles y mostos, utilizando electrodo de carbón vítreo modificado con nanotubos de carbono y búfer de fosfatos 0.2 M, pH 6 + cloruro de potasio 0.1 M.....	98
Figura 3-39. Cambio de corriente para mosto 4 y diferentes extractos acuosos, utilizando electrodo de carbón vítreo modificado con nanotubos de carbono y búfer de fosfatos 0.2 M, pH 6 + cloruro de potasio 0.1 M.....	99
Figura 3-40. Variación de la señal para diferentes concentraciones de ácido cafeico, búfer de fosfato de potasio, pH 6 + KCl 0.1 M y electrodo AC1W4R1 modificado con nanotubos de carbono.....	100
Figura 3-41. Comportamiento de la señal con diferentes concentraciones de ácido cafeico, búfer de fosfato de potasio, pH 6 + KCl 0.1 M y electrodo AC1W4R1 modificado con nanotubos de carbono.....	101

Figura 3-42. Variación de la concentración de solución de ácido cafeico, utilizando búfer de fosfato de potasio, pH 6 + KCl 0.1 M y electrodo AC1W4R1 modificado con nanotubos de carbono, ensayo 1.....	102
Figura 3-43. Variación de la concentración de solución de ácido cafeico, utilizando búfer de fosfato de potasio, pH 6 + KCl 0.1M y electrodo AC1W4R1 modificado con nanotubos de carbono, ensayo 2.....	103
Figura 3-44. Variación de la concentración de solución de ácido cafeico, utilizando búfer de fosfato de potasio, pH 6 + KCl 0.1M y electrodo AC1W4R1 modificado con nanotubos de carbono, ensayo 3.....	103
Figura 3-45. Comportamiento del cambio de corriente a lo largo del tiempo utilizando electrodo de platino AC1W2R1, cloruro de potasio y nitrato de potasio.....	105
Figura 3-46. Comportamiento de cambio de corriente a lo largo del tiempo utilizando electrodo de platino AC1W2R1 y ácido perclórico + cloruro de potasio.....	106
Figura 3-47. Cambio de variables fisicoquímicas a lo largo del tiempo.....	107
Figura 3-48. Cambio de concentración de glicerol a lo largo del tiempo.....	107
Figura 3-49. Cambio de concentración de variables calculadas a lo largo del tiempo....	108
Figura 3-50. Cambio de productividad a lo largo del tiempo.....	109
Figura 3-51. Análisis de componentes principales para ensayo de primer monitoreo de fermentación.....	110
Figura 4-1. Monitoreo de fermentación con diferentes insumos, con electrodo con electrodo de platino (AC1W2R1) y ácido perclórico y cloruro de potasio como búfer	113
Figura 4-2. Monitoreo fermentación con diferentes insumos, con electrodo de grafito (AC1W4R2) modificado con cobre y NaOH 0.1 M como búfer	113
Figura 4-3. Acidez total para fermentaciones con diferentes insumos colombianos.	114
Figura 4-4. Monitoreo de azúcares totales para fermentaciones con diferentes insumos colombianos con HPLC	114
Figura 4-5. Monitoreo de etanol para fermentaciones con diferentes insumos colombianos con HPLC.....	115
Figura 4-6. Análisis de componentes principales para fermentaciones con diferentes fuentes de carbono e insumos colombianos.....	115
Figura 4-7. Monitoreo fermentación con diferentes porcentajes de azúcar, con electrodo de carbón vítreo modificado con cobre y NaOH 0.1 M como búfer.....	117

Figura 4-8. Monitoreo de grados Brix para fermentaciones con diferentes porcentajes de azúcar	118
Figura 4-9. Acidez total para fermentaciones con diferentes porcentajes de azúcar.....	118
Figura 4-10. Monitoreo de absorbancia a 267 nm para fermentaciones con diferentes porcentajes de azúcar.....	119
Figura 4-11. Comportamiento de mostos con diferentes porcentajes de azúcar utilizando FTIR-ATR.....	119
Figura 4-12. Comportamiento de los hidromieles finales con diferentes porcentajes de azúcar utilizando FTIR-ATR	120
Figura 4-13. Monitoreo de fermentación con adición de especias e insumos colombianos con electrodo de platino (AC1W2R1) y ácido perclórico y cloruro de potasio como búfer.....	122
Figura 4-14. Monitoreo de fermentación con adición de especias con electrodo de grafito (AC1W4R2) modificado con cobre y NaOH 0.1 M como búfer	123
Figura 4-15. Acidez total para fermentación con adición de especias e insumos colombianos.	124
Figura 4-16. Consumo de azúcares totales para fermentación con adición de especias e insumos colombianos con HPLC.....	124
Figura 4-17. Producción de etanol para fermentación con adición de especias e insumos colombianos con HPLC.....	125
Figura 4-18. Producción de glicerol para fermentación con adición de especias e insumos colombianos con HPLC.....	125
Figura 4-19. Análisis de componentes principales para las fermentaciones con especias e insumos colombianos.....	126
Figura 4-20. Monitoreo de acidez de fermentaciones utilizando diferentes especias.....	129
Figura 4-21 Monitoreo de absorbancia a 267 nm de fermentaciones utilizando diferentes especias.....	129
Figura 4-22. Monitoreo azúcares totales para fermentaciones utilizando diferentes especias con HPLC.....	130
Figura 4-23. Monitoreo de etanol para fermentaciones utilizando diferentes especias con HPLC	130
Figura 4-24. Monitoreo de glicerol para fermentaciones utilizando diferentes especias con HPLC.....	131

Figura 4-25. Comportamiento para mostos de fermentaciones utilizando diferentes especias con FTIR-ATR.....	132
Figura 4-26. Comportamiento para hidromieles de fermentaciones utilizando diferentes especias con FTIR-ATR.....	132
Figura 4-27. Comportamiento para mostos de fermentaciones utilizando diferentes especias con PTR-MS.....	134
Figura 4-28. Comportamiento para hidromieles de fermentaciones utilizando diferentes especias con PTR-MS.....	135
Figura 4-29. Análisis de componentes principales para determinaciones con PTR-MS.....	135
Figura 4-30. Monitoreo de fermentación con adición de especias e insumos italianos con electrodo de platino (AC1W2R1) y ácido perclórico y cloruro de potasio como búfer.....	136
Figura 4-31. Monitoreo fermentación con adición de especias e insumos italianos con electrodo de grafito (AC1W4R2) modificado con cobre y NaOH 0.1 M como búfer.....	137
Figura 4-32. Acidez total para fermentación con adición de especias e insumos italianos.....	137
Figura 4-33. Consumo de azúcares totales para fermentación con adición de especias e insumos italianos con HPLC.....	138
Figura 4-34. Producción de etanol para fermentación con adición de especias e insumos italianos con HPLC.....	138
Figura 4-35. Producción de glicerol para fermentación con adición de especias e insumos italianos con HPLC.....	139
Figura 4-36. Análisis de componentes principales para las fermentaciones con especias e insumos colombianos.....	140
Figura 4-37. Análisis de componentes principales para todas las fermentaciones realizadas con especias con insumos colombianos..... e italianos.....	143
Figura 4-38. Monitoreo en fermentaciones contaminadas, con adición de especias e insumos italianos con electrodo con electrodo de platino (AC1W2R1) y ácido perclórico y cloruro de potasio como búfer.....	146
Figura 4-39. Monitoreo en fermentaciones contaminadas, con adición de especias e insumos italianos con electrodo de grafito (AC1W4R2) modificado con cobre y NaOH 0.1 M como búfer.....	146

Figura 4-40. Acidez total en fermentaciones contaminadas, con adición de especias e insumos italianos.....	147
Figura 4-41. Monitoreo de azúcares totales en fermentaciones contaminadas, con adición de especias e insumos italianos utilizando HPLC	147
Figura 4-42. Monitoreo de etanol en fermentaciones contaminadas, con adición de especias e insumos italianos utilizando HPLC	148
Figura 4-43. Análisis de componentes principales para fermentaciones con adición de especias, insumos italianos y contaminación.....	149
Figura 4-44. Monitoreo de fermentación de hidromieles con hierbas con electrodo de platino (AC1W2R1) y ácido perclórico y cloruro de potasio como búfer	151
Figura 4-45. Monitoreo de fermentación de hidromieles con hierbas con electrodo de grafito (AC1W4R2) modificado con cobre y NaOH 0.1 M como búfer	152
Figura 4-46. Monitoreo de azúcares totales utilizando HPLC para fermentación de hidromieles con hierbas.....	153
Figura 4-47. Monitoreo de producción de etanol (%p/v) utilizando HPLC para fermentación de hidromieles con hierbas	153
Figura 4-48. Monitoreo de acidez total para fermentación de hidromieles con hierbas.....	154
Figura 4-49. Análisis de componentes principales para las fermentaciones con hierbas.....	155
Figura 4-50. Monitoreo de fermentación de hidromieles con agraz y corozo, con electrodo de platino (AC1W2R1) y ácido perclórico y cloruro de potasio como búfer	158
Figura 4-51. Monitoreo de fermentación de hidromieles con agraz y corozo, con electrodo de grafito (AC1W4R2) modificado con cobre y NaOH 0.1 M como búfer	159
Figura 4-52. Acidez total para fermentación de hidromieles con agraz y corozo.....	159
Figura 4-53. Monitoreo de azúcares totales para fermentación de hidromieles con agraz y corozo utilizando HPLC.....	160
Figura 4-54. Monitoreo de etanol para fermentación de hidromieles con agraz y corozo utilizando HPLC	160
Figura 4-55. Análisis de componentes principales para fermentaciones con frutos rojos, diferentes fuentes de nitrógeno y tratamientos de higienización	161

Figura 4-56. Monitoreo de la corriente utilizando electrodo de carbón vítreo modificado con cobre y NaOH 0.1M como búfer	163
Figura 4-57. Monitoreo de dos tipos de señales obtenidas mediante la utilización de nariz electrónica comercial	164
Figura 4-58. Monitoreo de las señales obtenidas mediante la utilización de electrónica comercial	165
Figura 4-59. Monitoreo de acidez total a lo largo de fermentación	165
Figura 4-60. Monitoreo de azúcares totales a lo largo de fermentación utilizando HPLC	166
Figura 4-61. Monitoreo de producción de etanol a lo largo de fermentación utilizando HPLC	166
Figura 4-62. Análisis de componentes principales para fermentación tradicional y análisis con nariz y lengua electrónica comerciales.	167
Figura 4-63. Monitoreo de fermentación de hidromiel tradicional, con electrodo con electrodo de platino (AC1W2R1) y ácido perclórico y cloruro de potasio como búfer	170
Figura 4-64. Monitoreo fermentación de hidromiel tradicional, con electrodo de grafito (AC1W4R2) modificado con cobre y NaOH 0.1 M como búfer.....	170
Figura 4-65. Monitoreo de acidez total para fermentación de hidromiel tradicional	171
Figura 4-66. Monitoreo de consumo de azúcares totales mediante HPLC para fermentación de hidromiel tradicional	171
Figura 4-67. Monitoreo de concentración de etanol para fermentación de hidromiel tradicional mediante HPLC.....	172
Figura 4-68. Monitoreo de concentración de glicerol para fermentación de hidromiel tradicional mediante HPLC.....	172
Figura 4-69. Características sensoriales a lo largo del tiempo de fermentación para obtención de un hidromiel tradicional	173
Figura 4-70. Características sensoriales a lo largo del tiempo de fermentación para obtención de un hidromiel tradicional	174
Figura 5-1. Análisis de componentes principales para los hidromieles analizados utilizando todas las variables fisicoquímicas determinadas.....	183
Figura 5-2. Análisis de componentes principales para los hidromieles analizados utilizando señales con el sensor de cobre y platino.....	184
Figura 5-3. Análisis de componentes principales para hidromieles comerciales utilizando variables sensoriales determinadas y señales obtenidas mediante los sensores de cobre platino.	185

Lista de tablas

Tabla 1-1 Clasificación general de las pruebas de análisis sensorial.....	13
Tabla 2-1 Diferentes hidromieles comerciales evaluadas.....	31
Tabla 2-2 Condiciones de operación del cromatógrafo para determinación de azúcares y alcoholes.....	36
Tabla 2-3 Condiciones prueba de pulso diferencial e identificación de ruido en el sistema.....	48
Tabla 2-4 Significado de las siglas empleadas por BVT para nombrar sus sensores.....	49
Tabla 2-5 Sensores contenidos en el kit de inicio (Starting Kit).....	49
Tabla 2-6 Condiciones pruebas con ferricianuro de potasio.....	50
Tabla 2-7 Soluciones de sustancias puras utilizadas para ser evaluadas con el sistema electroquímico.....	51
Tabla 2-8 Condiciones utilizadas para evaluar diferentes soluciones de sustancias presentes en la fermentación alcohólica.....	51
Tabla 2-9 Condiciones pruebas con diferentes muestras y KCl 0.2 M.....	52
Tabla 2-10 Condiciones de las pruebas con diferentes muestras.....	53
Tabla 2-11 Condiciones de las pruebas con sensores de platino y solución de ácido perclórico + cloruro de potasio.....	53
Tabla 2-12 Condiciones de electrodeposición de cobre sobre sensores AC1W4R1 y electrodo de carbón vítreo.....	54
Tabla 2-13 Condiciones pruebas con soluciones de alcoholes y carbohidratos en medio alcalino y con electrodo de carbón vítreo modificado con cobre, usando voltametría cíclica.....	55

Tabla 2-14 Condiciones pruebas con soluciones de alcoholes y carbohidratos en medio alcalino y con electrodo de carbón vítreo modificado con cobre, utilizando voltametría de onda cuadrada.....	55
Tabla 2-15 Condiciones pruebas con alcoholes y carbohidratos en medio alcalino y con electrodo AC1W4R1 modificado con cobre, utilizando voltametría cíclica.....	56
Tabla 2-16 Condiciones para ensayos con ácido cafeico 10 mM, búfer de fosfato de potasio, pH 6 + KCl 0.1 M y electrodo de grafito modificado con nanotubos de carbono.....	58
Tabla 2-17 Condiciones para ensayos con ácido cafeico 10 mM, búfer de fosfato de potasio, pH 6 + KCl 0.1 M y electrodo de carbón vítreo modificado con nanotubos de carbono.....	58
Tabla 2-18 Condiciones para ensayos con ácido cafeico 10 mM, búfer de fosfato de potasio, pH 6 + KCl 0.1 M y electrodo de grafito modificado con nanotubos de carbono	59
Tabla 2-19 Condiciones para ensayos con ácido cafeico 10 mM, búfer de fosfato de potasio, pH 6 + KCl 0.1 M y electrodo de grafito modificado con nanotubos de carbono	59
Tabla 2-20 Condiciones para ensayos con ácido cafeico 56.8 μ M, electrodo de carbón vítreo modificado con nanotubos de carbono y diferentes soluciones.....	60
Tabla 2-21 Características de los sensores de detección utilizados.....	62
Tabla 2-22 Ensayos realizados para la selección de sensores	64
Tabla 2-23 Fermentaciones realizadas para monitoreo con diferentes técnicas de análisis.....	64
Tabla 3-1. Resultados Prueba Kruskal Wallis con 95% de confiabilidad para el sistema.....	65
Tabla 3-2. Soluciones de sustancias puras utilizadas para ser evaluadas con el sistema electroquímico.....	72
Tabla 3-3. Curvas de calibración obtenidas para diferentes ácidos orgánicos utilizando electrodo de platino y ácido perclórico + cloruro de potasio como búfer.....	86
Tabla 3-4. Curvas de calibración de las diferentes sustancias evaluadas con electrodo AC1W4R1 modificado con cobre y NaOH 0.1 M.....	93
Tabla 3-5. Curvas de calibración ácido cafeico, utilizando búfer de fosfato de potasio, pH 6 + KCl 0.1M y electrodo de carbón vítreo modificado con nanotubos de carbono.....	95
Tabla 3-6. Curva de calibración ácido cafeico, utilizando búfer de fosfato de potasio, pH 6 + KCl 0.1 M y electrodo AC1W4R1 modificado con nanotubos de carbono.....	100
Tabla 3-7. Curva de calibración para ácido cafeico, utilizando búfer de fosfato de potasio, pH 6 + KCl 0.1M y electrodo AC1W4R1 modificado con nanotubos de carbono.....	101
Tabla 3-8. Curvas de calibración ácido cafeico, utilizando búfer de fosfato de potasio, pH 6 + KCl 0.1 M y electrodo AC1W4R1 modificado con nanotubos de carbono.....	104

Tabla 3-9. Matriz de correlación para ensayo de primer monitoreo de fermentación.....	110
Tabla 4-1. Composición de los mostos evaluados.....	112
Tabla 4-2. Matriz de correlación para fermentaciones con diferentes fuentes de carbono e insumos colombianos.....	116
Tabla 4-3. Composición de los mostos evaluados.....	116
Tabla 4-4. Parámetros para análisis PLS de las variables determinadas y los espectros FTIR-ATR para fermentaciones con diferentes porcentajes de azúcar.....	120
Tabla 4-5. Composición de los mostos evaluados.....	121
Tabla 4-6. Matriz de Correlación para fermentaciones con especias e insumos colombianos.....	126
Tabla 4-7. Parámetros del modelo lineal múltiple para la señal con electrodo de cobre y fermentaciones con especias e insumos colombianos.....	127
Tabla 4-8. Variables estadísticas para modelo lineal múltiple para la señal con electrodo de cobre y fermentaciones con especias e insumos colombianos.....	127
Tabla 4-9. Parámetros del modelo lineal múltiple para la señal con electrodo de platino y fermentaciones con especias e insumos colombianos.....	128
Tabla 4-10. Variables estadísticas para modelo lineal múltiple para la señal con electrodo de platino y fermentaciones con especias e insumos colombianos.....	128
Tabla 4-11. Parámetros para análisis PLS de las variables determinadas y los espectros FTIR-ATR para fermentaciones utilizando diferentes especias.....	133
Tabla 4-12. Matriz de Correlación para fermentaciones con especias e insumos colombianos.....	140
Tabla 4-13. Parámetros del modelo lineal múltiple para la señal con electrodo de cobre y fermentaciones con especias e insumos italianos.....	141
Tabla 4-14. Variables estadísticas para modelo lineal múltiple para la señal con electrodo de cobre y fermentaciones con especias e insumos italianos.....	141
Tabla 4-15. Parámetros del modelo lineal múltiple para la señal con electrodo de platino y fermentaciones con especias e insumos italianos.....	142
Tabla 4-16. Variables estadísticas para modelo lineal múltiple para la señal con electrodo de platino y fermentaciones con especias e insumos italianos.....	142
Tabla 4-17. Matriz de Correlación para fermentaciones con especias e insumos colombianos e italianos.....	143

Tabla 4-18. Parámetros del modelo lineal múltiple para la señal con electrodo de cobre y fermentaciones con especias e insumos colombianos e italianos.....	144
Tabla 4-19. Variables estadísticas para modelo lineal múltiple para la señal con electrodo de cobre y fermentaciones con especias e insumos colombianos e italianos.....	144
Tabla 4-20. Parámetros del modelo lineal múltiple para la señal con electrodo de platino y fermentaciones con especias e insumos colombianos e italianos.....	144
Tabla 4-21. Variables estadísticas para modelo lineal múltiple para la señal con electrodo de platino y fermentaciones con especias e insumos colombianos e italianos.....	145
Tabla 4-22. Matriz de correlación para fermentaciones con adición de especias, insumos italianos y contaminación.....	149
Tabla 4-23. Composición de los mostos evaluados.....	150
Tabla 4-24. Matriz de Correlación para fermentaciones con hierbas.....	155
Tabla 4-25. Parámetros del modelo lineal múltiple para la señal con electrodo de cobre y fermentación con hierbas.....	156
Tabla 4-26. Variables estadísticas para modelo lineal múltiple para la señal con electrodo de cobre y fermentación con hierbas.....	156
Tabla 4-27. Parámetros del modelo lineal múltiple para la señal con electrodo de platino y fermentación con hierbas.....	156
Tabla 4-28. Variables estadísticas para modelo lineal múltiple para la señal con electrodo de platino y fermentación con hierbas.....	157
Tabla 4-29. Condiciones de los ensayos de fermentación utilizando frutos rojos (A) Agrav (C) Corozo.....	157
Tabla 4-30. Matriz de Correlación para análisis de componentes principales para fermentaciones con frutos rojos, diferentes fuentes de nitrógeno y tratamientos de higienización.....	162
Tabla 4-31. Parámetros del modelo lineal múltiple para la señal con electrodo de cobre y fermentaciones con frutos rojos.....	162
Tabla 4-32. Variables estadísticas para modelo lineal múltiple para la señal con electrodo de cobre y fermentaciones con frutos rojos.....	162
Tabla 4-33. Matriz de Correlación para análisis de componentes principales para fermentación tradicional y análisis con nariz y lengua electrónica comerciales.....	167
Tabla 4-34. Parámetros del modelo lineal múltiple para la señal con electrodo de cobre y fermentación de hidromiel tradicional con análisis con nariz y lengua electrónica.....	168
Tabla 4-35. Variables estadísticas para modelo lineal múltiple para la señal con electrodo de cobre y fermentación tradicional con análisis con nariz y lengua electrónica.....	169

Tabla 4-36. Matriz de correlación de datos para fermentación para obtención de hidromiel tradicional.....	174
Tabla 4-37. Parámetros del modelo lineal múltiple para la señal con electrodo de cobre y fermentación de hidromiel tradicional.....	175
Tabla 4-38. Variables estadísticas para modelo lineal múltiple para la señal con electrodo de cobre y fermentación de hidromiel tradicional.....	175
Tabla 4-39. Parámetros del modelo lineal múltiple para la señal con electrodo de platino y fermentación de hidromiel tradicional.....	175
Tabla 4-40. Variables estadísticas para modelo lineal múltiple para la señal con electrodo de platino y fermentación de hidromiel tradicional.....	176
Tabla 5-1 Resultados de variables fisicoquímicas determinadas para hidromieles con adición de especias e insumos colombianos.....	178
Tabla 5-2 Rendimiento y productividad para hidromieles con adición de especias e insumos colombianos.....	178
Tabla 5-3 Resultados de variables fisicoquímicas determinadas para hidromieles con adición de especias e insumos italianos.....	178
Tabla 5-4 Rendimiento y Productividad para hidromieles con adición de especias e insumos talianos.	179
Tabla 5-5 Resultados de variables fisicoquímicas determinadas para hidromieles con adición de hierbas y especias.....	179
Tabla 5-6 Rendimiento y Productividad para hidromieles con adición de hierbas y especias.....	180
Tabla 5-7 Resultados de variables fisicoquímicas determinadas para hidromieles con adición de agraz (A) y corozo (C), diferentes fuentes de nitrógeno y diferentes tratamientos de higienización	180
Tabla 5-8 Rendimiento y Productividad para hidromieles con adición de hierbas y especias.....	181
Tabla 5-9 Resultados de variables fisicoquímicas determinadas para hidromieles comerciales.....	181
Tabla 5-10 Perfil sensorial obtenido para muestras comerciales.....	182
Tabla 5-11 Matriz de correlación para variables fisicoquímicas determinadas.	184
Tabla 5-12 Matriz de correlación para variables sensoriales determinadas en hidromieles comerciales.....	186

Introducción

En nuestro país es ampliamente reconocida la necesidad de realizar proyectos de investigación que propendan por el fortalecimiento del desarrollo del sector agroindustrial, y en especial de las cadenas productivas. Una de esas cadenas, la apícola, se caracteriza porque no existe variedad en la oferta de productos, por lo cual se deben desarrollar alternativas para generar valor agregado a los productos tradicionales como la miel, el polen, la jalea real y el propóleo.

Adicionalmente, la cadena debería aprovechar la gran variedad de características sensoriales y fisicoquímicas de los productos apícolas colombianos (causadas por su diverso origen botánico y regional) y vislumbrar alternativas de mercado externo, ya que el mercado interno del principal producto de la cadena, la miel, es complicado debido a que su precio es mayor al internacional. Con ese panorama, actualmente la cadena apícola intenta unir los esfuerzos conjuntos de las entidades gubernamentales, empresarios e investigadores para mejorar la competitividad y productividad de este sector.

Una de las alternativas de mejora es el desarrollo de nuevos productos a través de la aplicación de bioprocesos. Considerando que el consumo de vinos en Colombia abarca en su mayoría vinos jóvenes dulces como el que se puede desarrollar empleando la miel como sustrato, en este proyecto se plantea el uso de microorganismos fermentadores productores de alcohol para la producción de un vino de miel (también llamado hidromiel). Es importante destacar que el hidromiel existe en Europa, Estados Unidos y Canadá y que el consumo de vinos que no son de uva allí es importante, representando el 10% del consumo en Europa occidental y el 30% en Europa oriental, por lo cual en el futuro se puede pensar en su exportación.

Este mercado potencial convierte a las bebidas alcohólicas a base de miel, en alternativas para la generación de mayor valor agregado para el sector apícola colombiano. Este producto hace parte de la industria alimenticia, donde es importante la homogeneidad de los

productos que se ve representada en calidad, ya que las características sensoriales de los alimentos y las expectativas de los consumidores en términos de gusto y sabor son las que determinan el éxito de un producto particular. Por ello, el análisis del sabor de un producto alimenticio determinado es vital. Generalmente, este análisis se realiza por medio de paneles sensoriales con jueces entrenados. Sin embargo, algunas veces estos paneles resultan costosos, y adicionalmente el desempeño de los jueces es variable dependiendo de diferentes factores, como su salud, conocimiento, experiencias y gustos propios, aspectos psicológicos, tales como el estado de ánimo, temperamento y personalidad, exceso de muestras o pruebas, errores lógicos, sugestión, halo, estímulo, etc. Por ello, la industria alimentaria debe desarrollar nuevos métodos de monitoreo y control de calidad capaces de estandarizar las características organolépticas de los alimentos a lo largo del proceso.

Hoy por hoy, el desarrollo tecnológico del proceso fermentativo para obtener bebidas fermentadas a partir de miel se lleva a cabo de manera incipiente, sin enfocarse en la generación de métodos de instrumentación enfocados en la estandarización del proceso fermentativo.

Con este fin se han creado instrumentos como las narices y las lenguas electrónicas, las cuales se basan en una combinación de sensores no específicos y un programa adecuado; estos instrumentos, operan en forma análoga a como lo hace la nariz y la lengua humana para percibir los sabores y olores. Estos equipos pueden proporcionar mediciones fiables de sabor, haciendo que sus resultados puedan respaldar los resultados del panel sensorial. Además, permiten la realización de mediciones directamente sobre la muestra, utilizando técnicas biomiméticas, que pueden establecer relaciones entre las variables sensoriales y las mediciones instrumentales. Esto permitiría establecer modelos para poder predecir y resolver problemas en los procesos fermentativos.

La generación de instrumentos que faciliten la estandarización del proceso fermentativo constituye un aporte al aseguramiento de la calidad del proceso productivo para la obtención de este producto alimenticio.

El presente proyecto tiene como objetivo general desarrollar un sistema de gusto artificial aplicable a la evaluación de la cinética de fermentación alcohólica para la obtención de bebidas a partir de miel de abejas. Para lograr dicho objetivo, se plantean tres objetivos específicos: evaluar el comportamiento de algunos componentes no volátiles del mosto de miel de abejas y bebida fermentada mediante técnicas electroquímicas, sensoriales y de

análisis químico instrumental; diseñar, construir y validar un prototipo de lengua electrónica a partir de insumos disponibles comercialmente, que sea aplicable a bebidas obtenidas por fermentación de miel de abejas; y realizar seguimiento en línea de la fermentación para observar su comportamiento cinético utilizando la lengua electrónica y establecer parámetros de calidad del producto.

A pesar que el hidromiel es una de las bebidas alcohólicas más antiguas de la humanidad, y en el mundo se han desarrollado lenguas electrónicas enfocadas a la evaluación de diferentes productos y procesos, actualmente no existe una herramienta de gusto artificial aplicable al desarrollo de bebidas alcohólicas a base de miel que permita llevar a cabo el seguimiento del comportamiento cinético de la fermentación y que esté relacionada con variables fisicoquímicas y sensoriales; por lo tanto, la generación de investigación que permita la obtención de productos aplicados a una realidad específica, como es la cadena apícola, y el desarrollo y la aplicación de un instrumento que permita el monitoreo de la fermentación para la obtención de bebidas alcohólicas a partir de miel es un paso muy importante que impulsaría la competitividad de la cadena apícola colombiana y contribuiría a la generación de conocimiento a través de un trabajo interdisciplinario.

1. Antecedentes

Se ha observado que la comercialización de miel como producto final no influye notablemente en el incremento de la competitividad de la cadena apícola colombiana frente al mercado latinoamericano (Espinal et al. 2006; Laverde et al. 2010). Por ello, se ha planteado que la introducción de miel como sustrato para la generación de bebidas alcohólicas tipo vino puede influir positivamente en la generación de nuevos productos.

Debido a las tendencias actuales de consumo de bebidas alcohólicas en Colombia, donde el vino está aumentando cada vez más su participación (crecimiento de 15% anual) en detrimento de bebidas como aguardiente, cerveza, whisky e incluso café, (Garcia et al. 2014) que entre los más vendidos están los vinos jóvenes dulces, especialmente de manzana, se vislumbra entonces la posibilidad de desarrollar una bebida alcohólica a base de miel similar a un vino joven dulce. El hidromiel tiene un costo que varía entre \$10000 a \$100000 por litro (Garcia et al. 2014), lo cual posiblemente permitiría la exportación del producto desarrollado.

En Colombia, las mieles tienen características diferentes de acuerdo con la región en la que son producidas, las especies florales con la que se relaciona y los procesos de extracción que se utilicen. Estas características fisicoquímicas y sensoriales diversas permiten la generación de productos apícolas bien diferenciados, que pueden tener un alto valor agregado. Esto junto con la alta productividad de miel reportada en nuestro país permite prever ventajas competitivas que permitirían augurar una buena probabilidad de éxito en la introducción de nuevos productos como el hidromiel.

Los antecedentes más importantes para este trabajo tienen relación con lo referente a la miel de abejas (características, clasificación, proceso de obtención), la cadena apícola colombiana, el vino de miel o hidromiel (obtención, clasificación, proceso de obtención), y los avances en lengua electrónica (antecedentes, principios, aplicaciones). Dichos

antecedentes enmarcan el trabajo realizado, en un contexto actual y relacionado con la realidad nacional.

1.1 Cadena productiva de las abejas y la apicultura (CPPA) en Colombia

El Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural impulsa en el país la política de Cadenas Productivas en el marco de la ley 811 de 2003, con el objetivo de contar con órganos consultivos para el desarrollo de políticas orientadas hacia el desarrollo de la competitividad de los diferentes sectores agropecuarios,(Laverde et al. 2010).

Entre ellas se encuentra la Cadena Productiva de las Abejas y la Apicultura (CPAA), que está conformada a partir de la convocatoria y vinculación de personas, organizaciones, empresas, entidades y representantes de los diferentes eslabones (productores, comercializadores, agroindustria, academia, instituciones, proveedores, entre otros). Con esta cadena se pretende: formular la línea base para la competitividad, construir el Plan Estratégico de Acción, mejorar la productividad y competitividad, desarrollar el mercado, disminuir los costos de transacción entre los distintos agentes de la cadena, desarrollar alianzas estratégicas de diferente tipo, mejorar la información entre los agentes de la cadena, vincular los pequeños productores y empresarios a la cadena, manejar mejor los recursos naturales y el medio ambiente, formar recursos humanos y mejorar la investigación y el desarrollo tecnológico (Laverde et al. 2010).

Es claro que para todos los actores de la cadena son de particular interés las perspectivas futuras de desarrollo social, económico, ambiental y tecnológico de la cadena productiva agroindustrial de las abejas y la apicultura (CPAA) en Colombia (Laverde et al. 2010). Especialmente, en términos de generación de empresas y empleo, consolidación del mercado interno, incremento de las exportaciones, cubrimiento de nuevos mercados internacionales y la innovación de productos y servicios de alto valor agregado, con sostenibilidad ambiental. La cadena también ha identificado que el incremento de la competitividad es una necesidad debido a la cada vez mayor apertura económica y liberalización del mercado y que la atención del mercado interno como el ingreso a los mercados externos conllevan para la cadena ajustes estructurales de su productividad y

competitividad; por lo cual es importante construir ventajas competitivas, a partir del mejoramiento y profundización de los procesos de investigación y desarrollo tecnológico.

Todo ello aprovechando diversos aspectos como el crecimiento del mercado, el incremento en el número de consumidores, la mayor demanda por productos naturales, las ventajas biofísicas y de flora de Colombia, así como la existencia de varias especies de abejas en el país. Especialmente esta última, ya que en Europa y Estados Unidos la disponibilidad de abejas se ha reducido a tal punto que ya comienzan a desaparecer.

Sin embargo, también es importante mencionar que se han encontrado grandes problemas como falta de calidad de los productos apícolas ofrecidos por los productores nacionales, escaso cumplimiento de normas, carencia de estudios específicos sobre inteligencia de mercados, exiguo acceso a los créditos disponibles, necesidad de una mayor formación técnica y comercial de los apicultores, entre otras.

1.2 Miel

La miel es un fluido dulce y viscoso producido por las abejas domésticas a partir del néctar de las flores, de secreciones de partes vivas de plantas o de excreciones de insectos chupadores de plantas, que es libado, modificado y almacenado en colmenas. El néctar es recogido de las flores por las abejas que lo almacenan en su saco para miel mientras se encuentran en el campo (Fattori 2004). Las abejas transforman los carbohidratos del néctar a través de un proceso de regurgitación usando invertasa y una digestión parcial, a través de ácidos gástricos. Estos dos procesos los realizan todas las abejas de la colmena. La solución acuosa resultante posee un alto contenido de agua, por lo que en la siguiente etapa del proceso se elimina un gran contenido de humedad mediante el movimiento sincronizado y simultáneo de las alas de las abejas, que favorece la convección y hace que la transferencia de masa del agua sea más rápida.

Las abejas depositan la miel transformada en celdas abiertas, hexagonales, construidas con cera que segregan por medio de glándulas especiales. En estas celdas ventiladas se lleva a cabo la maduración de la miel, etapa que consiste en la pérdida de agua e hidrólisis de la

sacarosa, después de la cual las abejas sellan las celdas con una capa de cera (operculado).

En el Anexo A, se puede encontrar información detallada en cuanto a la clasificación de la miel, composición, proceso de extracción, información de mercado, usos, entre otros.

Es importante resaltar que las mieles colombianas tienen características organolépticas especiales que se relacionan con el origen geográfico del cual provienen; adicionalmente, debido a que no hay estaciones, la producción se realiza de forma constante. Aunque Colombia no es un gran productor de miel, como lo son China y Rusia, las características fisicoquímicas y la disponibilidad de la misma pueden ser ventajas competitivas frente a otras mieles producidas masivamente.

1.3 Hidromiel

Uno de los productos que pueden ser una alternativa para producir mayor valor agregado en la cadena apícola es el hidromiel. Este es una bebida fermentada como se menciona en una revisión sobre el tema realizada en Portugal, (Ramalhosa et al. 2011). El desarrollo de esta bebida puede ser una buena opción para aumentar los ingresos de los productores de miel debido a que posee un gran potencial comercial. Gracias a las nuevas tendencias y consumidores, la generación de nuevas presentaciones de hidromiel en los mercados (por ejemplo, dulce, seco, con jugo de frutas) puede ayudar a los productores a aumentar los ingresos (Ramalhosa et al. 2011).

El hidromiel es una de las bebidas más antiguas y probablemente es precursora de la cerveza. Su amplia difusión fue reportada por los egipcios, griegos, celtas, sajones y bárbaros. En América esta bebida era elaborada por los mayas, quienes disolvían la miel de abejas sin aguijón (Meliponas) con agua, la maceraban con trozos de la corteza de un árbol y la fermentaban hasta obtener un licor empleado en sus festividades (Berry 2009).

Esta bebida se obtiene por fermentación alcohólica de miel diluida, la cual alcanza un contenido de 8 hasta 12 %v/v de etanol. El proceso de producción de hidromiel se divide en dos etapas generales. En la primera se lleva a cabo la adecuación de la miel, pues tiene un alto contenido de carbohidratos y un contenido de minerales bajo; por ende, se debe garantizar un balance adecuado para que las levaduras puedan llevar a cabo su fermentación. Adicionalmente, el contenido inicial de microorganismos en la miel puede

competir con las levaduras que se utilicen para la fermentación (Berry 2009). En la segunda, se lleva a cabo la transformación de los azúcares de la miel en alcohol etílico y dióxido de carbono a través de la fermentación que realizan las levaduras. Esta fermentación dependerá de la variedad de la miel, los nutrientes adicionados, (Pereira et al. 2009), la acidez y pH del medio, así como de la cepa de levadura empleada (Marián Navrátil et al. 2001). Entre estos factores, la levadura es un factor determinante en el proceso puesto que influye en la productividad de alcohol, en la velocidad de reacción del proceso y en el desarrollo del sabor y olor característico. El contenido de nitrógeno del medio también es muy importante, por lo que es necesario adicionar componentes que sean fuente de este. Así mismo, para propiciar un adecuado ambiente de crecimiento se requiere ajustar el pH y la temperatura, por lo cual en algunos casos se adicionan ácidos orgánicos (Ramalhosa et al. 2011).

A pesar de ser una de las bebidas alcohólicas más antiguas, en la bibliografía científica se encuentran pocos estudios en los que se tome como problema de investigación los aspectos correspondientes a hidromieles.

Para que la producción de hidromiel sea rentable, es necesario disminuir el tiempo de producción. En la revisión realizada por Ramalhosa et. al, se menciona también que la velocidad de fermentación depende de la variedad de la miel y sus características, y que a través de una adecuada selección de la levadura y de las condiciones de fermentación, tales como, mezclado durante la fermentación, la nutrición de levadura, y el control del pH, puede ser posible aumentar notablemente la tasa de fermentación (Ramalhosa et al. 2011).

Se han realizado pocos estudios sobre la selección de levaduras en cuanto a la producción e hidromiel (Pereira et al. 2009), por lo cual es necesario encontrar y aislar cepas de levaduras más resistentes, y con un mayor rendimiento teniendo en cuenta factores como altos valores osmóticos y bajo contenido de nitrógeno (Ramalhosa et al. 2011). Es necesario que los productores de hidromiel sean conscientes que la variabilidad de la miel hace que la adición de suplementos cambie y que muchos de los olores distintivos de los hidromieles se deben a su origen botánico y geográfico (Sroka & Tuszyński 2007a), (Roldán et al. 2011a). Algunos de estos compuestos pueden actuar como fuentes de carbono y nitrógeno para el metabolismo de la levadura, o pueden transformarse químicamente. Por lo tanto, es necesario realizar investigaciones para caracterizar tanto la miel como el hidromiel en cuanto a su composición, pues su origen es responsable de sus propiedades

organolépticas, todo ello con miras al control de calidad de las características organolépticas del hidromiel (Ramalhosa et al. 2011). Algunos autores han reportado algunos resultados acerca de este tema (Vidrih & Hribar 2007; Mendes-ferreira et al. 2010; Mcconnell et al. 2012; Daniel & Schramm 1995; Roldán et al. 2011a).

Tampoco se han realizado suficientes estudios en cuanto al análisis sensorial para conocer el gusto de los consumidores frente al hidromiel (Barrios & Principal 2010; Roldán et al. 2011a). Por lo tanto, los ajustes que se hagan después de la fermentación y las condiciones de maduración podrían afectar la preferencia de los consumidores (Ramalhosa et al. 2011).

En cuanto al proceso de producción del hidromiel, hay algunos reportes en los que se ha realizado la inmovilización de levaduras (Marián Navrátil et al. 2001; Qureshi & Tamhane 1985; Qureshi & Tamhane 1986; Qureshi & D. Tamhane 1987; Qureshi & D. V Tamhane 1987; Sroka et al. 2013) y evaluación de diferentes variables de proceso (Mendes-ferreira et al. 2010; Daniel & Schramm 1995; Mcconnell et al. 2012; Ouyang et al. 2013; Menezes et al. 2013; Roldán et al. 2011a), así como también acerca de la evaluación del contenido de compuestos fenólicos (C. Wintersteen et al. 2005; Kahoun, Řezková, et al. 2008).

En el Anexo B se puede encontrar información detallada acerca del mercado del vino, del hidromiel, su clasificación, fermentación alcohólica, entre otra información relevante acerca del hidromiel. Es importante resaltar que el seguimiento de la fermentación utilizando una herramienta instrumental y sensorial es una contribución importante al desarrollo no sólo de este tipo de bebidas sino del proceso para su obtención.

1.4 Análisis y seguimiento de fermentaciones etanólicas

Tradicionalmente, para llevar a cabo el seguimiento de las fermentaciones etanólicas a nivel industrial se han empleado mediciones sencillas como grados Brix, grados de alcohol (grados Gay Lussac), porcentaje de acidez volátil, entre otras. Al final del proceso, se hacen evaluaciones sensoriales comparativas para determinar si el producto final está dentro de los parámetros sensoriales especificados en un producto patrón conocido.

También, a nivel investigativo, se ha realizado el seguimiento de la fermentación, empleando técnicas como la cromatografía líquida para cuantificación de alcoholes, ácidos orgánicos y azúcares, así como cromatografía de gases para ácidos y alcoholes (Colombié et al. 2007; Buratti et al. 2011; Lamberti et al. 2009; Sablayrolles 2009).

Cuando en las fermentaciones se tiene una composición sencilla del medio de cultivo, es fácil llevar a cabo el seguimiento del crecimiento de biomasa o consumo de sustrato utilizando diferentes técnicas como Kjeldahl peso seco, espectrofotometría, conductividad eléctrica, turbidez, entre otros. Pero debido a que la miel de abejas cuenta con la presencia de diferentes sustancias como aminoácidos, ácidos orgánicos y otros nutrientes, las técnicas recomendadas para gran número de fermentaciones no se pueden usar para hacer el seguimiento tanto de consumo de sustrato como de producción de biomasa, y por lo tanto, se hace necesario encontrar herramientas que permitan llevar a cabo estas determinaciones de una forma sencilla.

1.5 Análisis sensorial

En la industria apícola, y en general, en la industria de alimentos, las características sensoriales de los productos son muy importantes para los mercados actuales, puesto que el consumidor busca excelencia y calidad, y por ende, estas características se convierten en metas fundamentales para los productores de alimentos y bebidas. Es así como la aceptabilidad de un producto determinado por parte del consumidor está conformada por distintos aspectos recogidos por los sentidos: vista, olfato, tacto, oído y gusto.

Hoy en día, en la industria apícola la evaluación sensorial es una técnica de medición tan importante como los métodos químicos, físicos o microbiológicos. Esta es realizada por un panel humano y tiene como ventaja que la persona efectúa mediciones a través de sus sentidos, es decir, sus propios instrumentos de análisis. No obstante, existe la idea equivocada de que el análisis sensorial no es tan riguroso como los otros tipos de análisis, a pesar de que esta técnica está fundamentada en ramas de la ciencia tales como la estadística, fisiología, psicología, entre otras.

Dentro de los métodos de análisis sensorial aplicados a la calidad más utilizados, se tienen: escalas objetivas basadas en instrumentos de medición, y métodos basados en el juicio humano (análisis sensorial). Las relaciones que existen entre estos métodos son las que garantizan el desarrollo de productos acordes con lo que espera el consumidor con respecto a un producto de calidad.

Sin embargo, debido a que es una técnica en la que los seres humanos son los evaluadores, puede haber cierto grado de subjetividad o, saturación debido a fatiga; por

esto, es importante trabajar en el desarrollo de una herramienta instrumental que permita solucionar este inconveniente.

1.5.1 Definición

En general, en la industria de alimentos, las características sensoriales de los productos son muy importantes para los mercados actuales, y por ende se convierten en metas fundamentales para los productores de alimentos y bebidas. Así es como la aceptabilidad de un producto determinado por parte del consumidor está conformada por distintos aspectos recogidos por los sentidos: vista (color y defectos), olfato (olor y *flavor*), tacto (manual y bucal), oído (tacto y durante la masticación) y gusto (sabor). El consumidor a la hora de decidir sobre la adquisición de un producto tiene en cuenta aspectos de calidad, tanto externos como internos. Es por ello que el análisis sensorial se transforma en una herramienta de mucha utilidad, pues permite encontrar los atributos de valor importantes para los consumidores.

1.5.2 Tipos de pruebas

Existen diferentes pruebas de análisis sensorial que se pueden utilizar. Estas se pueden dividir en dos grandes grupos: analíticas (discriminativas, descriptivas) y afectivas.

- **Pruebas afectivas**

También llamadas hedónicas. Son usadas para evaluar la preferencia y aceptación de un producto, y no se llevan a cabo con panelistas entrenados sino con consumidores que hagan parte del grupo objetivo hacia el cual va dirigido el producto.

- **Pruebas Analíticas**

Se utilizan para identificar diferencias o semejanzas; se llevan a cabo con panelistas entrenados.

Pruebas analíticas discriminativas

Son muy utilizadas en la industria porque son muy sencillas. Se pueden utilizar para determinar si existe diferencia entre dos muestras y para la determinación de umbrales y sensibilidad.

Pruebas analíticas descriptivas

Son una metodología que permite hacer una descripción completa de los productos y brinda la base para determinar las características sensoriales importantes para la aceptación por parte de consumidor; también permite relacionar las variables de proceso y formulación con los cambios en las características sensoriales.

En la tabla 1-1 se presenta la clasificación general para los métodos de evaluación sensorial, y los principales tipos de pruebas sensoriales.

Tabla 1-1 Clasificación general de las pruebas de análisis sensorial

Clasificación general	Tipo de prueba	Función	Aplicación
Afectivas	Preferencia	Conocer la opinión del consumidor	<ul style="list-style-type: none"> • Mejoramiento de producto, reformulación, desarrollo de nuevos productos: percepción del consumidor
	Grado de satisfacción		
	Aceptación		
Análíticas discriminativas	Comparación pareada simple	Detectar diferencias. Usadas normalmente en grupo de expertos que dan una valoración más objetiva	<ul style="list-style-type: none"> • Reformulación: Estudio de la influencia de la variación de materias primas, procesos, ingredientes, almacenamiento • Control de calidad del producto • Selección y adiestramiento de jueces
	Dúo-trío		
	Triangular		
	Comparaciones múltiples		
	Ordenamiento		
	Perfil		
	Análisis descriptivo comparativo		
Análíticas descriptivas	Escalas	<ul style="list-style-type: none"> • Establecer la dirección de las diferencias y la magnitud de las diferencias • Describir un producto 	<ul style="list-style-type: none"> • Reformulación: Magnitud de la influencia de la variación: materia prima, proceso, ingredientes, almacenamiento • Desarrollo de nuevos productos: estudio de atributos y parámetros que más influyen en la percepción sensorial • Control de calidad de producto: definición de técnicas instrumentales • Selección y adiestramiento de jueces • Descripción de la calidad sensorial del producto • Mejoramiento de producto: Comparación del producto • Monitoreo de la competencia: Cómo está el producto actual frente a la competencia.
	Perfil		
	Análisis descriptivo comparativo		

Con el fin de lograr resultados más objetivos, los criterios más importantes son la confiabilidad y la validez. Estos se relacionan con la seguridad de los resultados obtenidos, la medida de la exactitud con que se ha reflejado la calidad del producto evaluado (Torricella & Huerta 2008; Torricella et al. 2007). Debe tenerse en cuenta que la confiabilidad de los resultados de cualquier análisis realizado, su objetividad, depende eminentemente de los miembros, de las condiciones de realización, del método utilizado y de cómo se aplica.

1.5.3 Análisis sensorial a través de instrumentos

El análisis sensorial busca desarrollar una metodología objetiva para la determinación de parámetros organolépticos en los alimentos. En general, las mediciones instrumentales son un complemento a las evaluaciones sensoriales que llevan a cabo los seres humanos.

Dentro de las metodologías instrumentales consideradas objetivas, se encuentra el color, el cual puede ser medido de forma instrumental, más efectivamente que de forma visual. También existen otros aparatos como los texturómetros universales y la gran variedad de pruebas encaminadas a determinar parámetros reológicos como la dureza, fibrosidad, harinosidad, adhesividad, jugosidad, entre otras.

Existen otras evaluaciones instrumentales, denominadas técnicas semiobjetivas. Se incluyen dentro de este grupo las cromatografías y las valoraciones físicoquímicas y bioquímicas, indicadoras de la composición cualitativa del producto (sus vitaminas, elementos minerales, proteínas, ácidos y azúcares, colorantes, edulcorantes artificiales, etc.) aspecto íntimamente ligado a las propiedades sensoriales y al margen de aceptabilidad del alimento. Todas estas técnicas pueden llegar a tener una buena correlación en sus medidas con el juicio sensorial, pero es muy difícil que reemplacen totalmente al ser humano.

Con el fin de complementar las mediciones obtenidas a través de paneles sensoriales tradicionales, surgen las narices y lenguas electrónicas, las cuales operan de una manera análoga a como lo hacen los humanos para percibir los sabores y olores, y estos equipos están proporcionando soluciones al problema de mediciones fiables del sabor y olor (Rudnitskaya & Legin 2008b). La nariz electrónica únicamente mide los compuestos químicos volátiles que constituyen el olor de una muestra, así que para complementar a la nariz electrónica se ha desarrollado la lengua electrónica que mide los componentes no

volátiles cubriendo el olor y el sabor (Di Natale et al. 2000). La utilización de nariz o lengua electrónica permite unificar resultados sensoriales proporcionados por el panel o por los análisis cromatográficos; y después de una etapa de entrenamiento, se pueden utilizar sus resultados como sustitución de los métodos actuales, permitiendo establecer diferentes relaciones y conclusiones con respecto al producto, materias primas y desarrollo de un proceso, de acuerdo por lo presentado por diversos autores (Kollmannsberger & Nitz 2007; Deisingh 2004).

Actualmente, el estudio de la nariz electrónica ha ganado un interés creciente, ya que han demostrado ser útiles para muchas aplicaciones, por lo que hay diferentes instrumentos en el mercado. Una nariz electrónica consiste en una matriz de sensores de gases con diferentes patrones de selectividad, una unidad de toma de la señal y el software de reconocimiento de patrones. El principio se basa en el hecho de que un gran número de compuestos diferentes contribuye a la definición de un olor a medida, las relaciones químicas del conjunto de sensores de la nariz electrónica proporciona una salida del patrón que representa una combinación de todos los componentes. La razón del gran número de olores que se pueden detectar, es que, aunque la selectividad de cada sensor puede ser baja, la combinación de las clases de selectividad de varios proporciona una información muy grande en contenido (Bleibaum 2002).

Hasta la fecha, no existe un instrumento que por sí solo sustituya totalmente el análisis sensorial, ya que éste debería unificar todos los métodos analíticos encaminados a evaluar el aspecto exterior, el sabor y el olor de todos los alimentos. En general, las mediciones instrumentales son un complemento a las evaluaciones sensoriales que llevan a cabo los seres humanos, y deben permitir establecer relaciones o modelos que faciliten el seguimiento, control y optimización de procesos. Pero el desarrollo de instrumentos que faciliten y apoyen la labor del pánel sensorial hace que se constituya en una herramienta poderosa a la hora de definir lo que sucede a lo largo del proceso fermentativo (Rudnitskaya & Legin 2008a; Söderström et al. 2005).

La generación de instrumentos como la lengua electrónica, se basan en entender cómo funciona el gusto en los humanos, teniendo en cuenta principios químicos sencillos, lo que hace que su uso se esté llevando a cabo, no solo para alimentos sino para otro tipo de aplicaciones, pues constituye una técnica de análisis en la que la muestra debe sufrir pocos tratamientos, lo que la convierte en una técnica fácilmente implementable en procesos

productivos para llevar a cabo determinaciones en línea, estableciendo posibles problemas y soluciones que se presentan en diferentes tipos de procesos.

En la literatura científica se reportan avances tecnológicos en nariz electrónica, por ejemplo, se ha profundizado en el diseño de sensores, materiales, innovaciones de software y en el diseño de microcircuitos y sistemas de integración (Wilson & Baietto 2009), los cuales son antecedentes importantes para los desarrollos que se han dado en cuanto a la lengua electrónica. En estos dispositivos se han utilizado diferentes tipos de sensores, teniendo en cuenta diferentes principios y mecanismos de detección, lo cual está ligado con la expansión de nuevas aplicaciones. Wilson & Baietto mencionan también mencionan que la nariz electrónica ha proporcionado una gran cantidad de beneficios a una variedad de industrias comerciales, incluidos los sectores: agrario, biomédico, cosmético, medio ambiente, alimentos, militar, farmacéutico, de reglamentación y la investigación científica en varios campos.

En la actualidad hay un cambio en la actitud dentro de la tecnología de medición sobre cómo recoger y procesar la información. Se busca obtener información sobre atributos tales como la calidad, condición o estado de un proceso. Esto se hace mediante el uso de matrices de sensores de acuerdo con su selectividad, superposición y el tratamiento de los datos obtenidos por métodos multivariados (Wilson 2013).

1.6 Lengua electrónica

Las lenguas electrónicas se componen básicamente de un conjunto de sensores en donde cada uno de ellos mide una propiedad determinada de la muestra, ofreciendo una característica específica para cada especie analizada, la suma de todas estas características en la muestra permite establecer un patrón de reconocimiento para cada sabor.

Para el tratamiento de los datos obtenidos a través de este tipo de sistemas de gusto artificial, se utilizan métodos de análisis multiparamétrico que recogen toda la información que se obtiene de los sensores, seleccionan la que puede ser más significativa y, mediante algoritmos para reconocimiento de patrones, interpretan la señal de todos los sensores (Scampicchio et al. 2008).

Es por ello que una disciplina como la quimiometría, se convierte en un puente real entre los datos experimentales, los métodos de seguimiento, y la aplicación al seguimiento de procesos (Zhou et al. 2010). Muchos de los investigadores que trabajan acerca de la aplicación de lenguas electrónicas mencionan la importancia del análisis multivariado, así como el procesamiento de las señales obtenidas con el fin de generar herramientas útiles (Cetó et al. 2013; Campos et al. 2012; Alcañiz et al. 2012).

1.6.1 Antecedentes de la lengua electrónica

Como se mencionó anteriormente, el origen de la lengua electrónica se basa en el principio de funcionamiento de la nariz electrónica. Análogamente, existen conceptos similares para el análisis de líquidos.

Estos se han denominado "lengua electrónica" o sensor de gusto, y se han utilizado teniendo en cuenta su relación con el sentido del gusto. La mayoría de sensores empleados en esta aplicación se basan en electroquímica clásica, utilizando métodos, tales como la potenciometría, voltametría y conductimetría (Oliveri et al. 2010). El término de lengua electrónica fue creado por los investigadores Di Natale, Legin y colaboradores en 1996 en la conferencia X Eurosenors (Oliveri et al. 2010).

Existen antecedentes previos, en los que ya se habla de lengua artificial; Harper y Rossetto en 1978 mencionan la construcción de un dispositivo para determinaciones basadas en conductancia, pero este trabajo estuvo aislado por muchos años. En 1990 Toko y colaboradores desarrollaron membranas lipídicas sensibles a la detección de sabor dulce, ácido, amargo y umami (Oliveri et al. 2010; Wang & Rogers 1995) .

1.6.2 Principios de la lengua electrónica

Dentro de las técnicas más comunes empleadas en los sistema de gusto artificial, o lenguas electrónicas, se encuentran las técnicas electroanalíticas, las cuales relacionan cambios de energía química en eléctrica, y generalmente se refieren a la obtención de determinaciones eléctricas tales como corriente, potencial o carga y su relación con diferentes parámetros químicos (Wang 2000). Su popularidad se ha incrementado debido a los avances que durante las décadas de los años 80 y 90 se llevaron a cabo en cuanto a las interfaces, capas moleculares, inclusión de componentes biológicos, aparición de transductores

electroquímicos, caracterización microscópica, aparición de microelectrodos y sistemas de flujo, etc. (Wang 2000).

La diferenciación entre las diferentes técnicas electroanalíticas se relacionan con el tipo de señal eléctrica utilizada para la cuantificación. Los dos tipos principales de determinaciones electroanalíticas son las mediciones potenciométricas y las potenciostáticas.

Ambas requieren al menos dos electrodos conductores y una solución electrolítica que permita el contacto con la muestra. Por lo tanto, la superficie del electrodo es la unión entre un conductor aniónico y un conductor electrónico. Uno de los dos electrodos cambia de acuerdo con el analito, y por ende se denomina electrodo de trabajo, y el segundo de referencia, debido a que el potencial permanece constante e independiente a las propiedades de la solución electrolítica (Brett & Brett 1993). Las celdas electroquímicas pueden clasificarse en electrolíticas, cuando consumen energía de una fuente externa, y galvánicas, cuando producen energía eléctrica.

La potenciometría es una técnica en la que la corriente es cero, en la cual la información de la muestra se obtiene por el potencial que se establece a través de una membrana. Se han desarrollado diferentes materiales para estas membranas y ellas pueden reconocer diferentes procesos de ionización. Este tipo de técnica se utiliza generalmente para el monitoreo directo de especies iónicas tales como calcio, flúor e iones potasio. Este tipo de técnica se aplica directamente de la ecuación de Nernst a través de la medición de los potenciales de electrodos no polarizados sin que circule corriente. Los potenciales dependen de la naturaleza y concentración de las especies iónicas en solución, las del medio y el tipo de electrodos. Se pueden determinar teóricamente estos valores para sistemas simples, basándose en consideraciones de las variaciones de la energía libre (Wang 2000).

Las técnicas de potencial controlado, o potenciostáticas se relacionan con el estudio de la transferencia de carga en la interfase solución-electrodo; se basan en la determinación de situaciones dinámicas, es decir, cuando la corriente determinada no es cero. En este tipo de técnicas, el potencial de los electrodos se utiliza para dar origen a una reacción de transferencia de electrones cuyo resultado es una corriente, la cual es medida. En este caso, el rol del voltaje o potencial es análogo a la longitud de onda para las determinaciones ópticas. Se puede determinar como un parámetro controlable la “presión electrónica”, la cual obliga a las especies químicas a ganar o perder electrones (reducción y oxidación).

De acuerdo con la corriente resultante, ésta representa la velocidad a la cual los electrones se mueven a través de la interfase electrodo-solución. Estas técnicas potencioestáticas pueden determinar diferentes especies químicas que sean electroactivas, es decir que se puedan reducir u oxidar. El conocimiento de la reactividad de los grupos funcionales de un compuesto determinado se utiliza para predecir su electroactividad. Los compuestos que no son electroactivos también pueden detectarse llevando a cabo diferentes procedimientos de derivatización (Wang 2000).

Las ventajas de las técnicas de potencial controlado incluyen alta sensibilidad, selectividad frente a especies electroactivas, amplio intervalo lineal, portabilidad, bajo costo de instrumentación, capacidad de especificación y una amplia variedad de electrodos que pueden utilizarse en diferentes medios. Adicionalmente, se pueden encontrar límites de detección del orden nanomolar utilizando pequeños volúmenes de muestra. La selectividad de este tipo de electrodos puede incrementarse si se acoplan este tipo de mediciones con cromatografía líquida o determinaciones ópticas (Oliveri et al. 2010).

La mayoría de las investigaciones en este campo se han dedicado al desarrollo de los electrodos adecuados. Por ejemplo, existen membranas semipermeables de varios tipos que han demostrado diversos grados de selectividad y especificidad adecuadas para ser combinados con técnicas de reconocimiento de patrones (Winqvist et al. 2000), (Toko 1998). Las áreas de aplicación incluyen el cuidado de la salud (análisis de orina) y análisis de alimentos (Scampicchio et al. 2008; Viswanathan et al. 2009; Winqvist et al. 2000; Winqvist et al. 1997; Prien 2007; Vlasov et al. 2008; Suzuki 2008; Zeravik et al. 2009; Zhou et al. 2010); se han utilizado sensores potenciométricos de estado sólido para la detección de iones de metales pesados (Di Natale et al. 1997), mientras que se han reportado membranas de vidrio para el análisis de alimentos y vigilancia del medio ambiente (Legin 2000; Vlasov 2000).

En cuanto a este tipo de dispositivos, es importante también tener en cuenta que existen diferentes tipos de sensores.

Dentro de los sensores más importantes, se encuentran los voltamétricos, potenciométricos y otros. En esta última clase se incluyen los sensores de conductividad, entre otros.

▪ **Sensores Potenciométricos**

Se basan en la determinación de una diferencia de potencial en condiciones de circuito abierto entre el electrodo de trabajo y uno de referencia.

Los sensores potenciométricos son el grupo de dispositivos electroquímicos más desarrollados y estudiados. La mayor aplicación es la fabricación de electrodos selectivos de iones (ISE), donde se modifica el electrodo de trabajo por una membrana selectiva a un ion determinado.

La primera lengua electrónica disponible comercialmente en el mercado estaba compuesta por sensores potenciométricos y fue presentada por Kiyoshi Toko en 1998; ésta logró la clasificación de muestras como: aguas minerales, cervezas, café, té, etc. (Toko, 2004; Toko, 1998a, 2000).

▪ **Sensores Voltamétricos**

La voltamperometría permite el estudio de la composición de una solución electrolítica mediante el trazado de sus características corriente / tensión. En el procedimiento habitual, la corriente que fluye entre dos electrodos se mide cuando un potencial variable se aplica a uno de ellos (el electrodo polarizable, el otro es el electrodo de referencia que se mantiene a un potencial fijo). La información obtenida es diferente cuando se cambia la forma de la onda de voltaje, (rampa, pulso, etc.), la amplitud o los electrodos de trabajo. Este método a menudo combina una alta sensibilidad con poca selectividad, por lo que la mayoría de los trabajos en este campo se han dedicado al desarrollo de determinados electrodos de trabajo.

Los sensores potenciométricos han tenido innumerables avances a lo largo de los años y obviamente también tienen perspectivas no solo en aplicaciones, sino en el desarrollo y mejoramiento de los mismos (del Valle 2012). Por ello, con esta técnica se han obtenido buenos resultados para la clasificación de distintos tipos de alimentos, tales como agua, leche y otras bebidas utilizando electrodos metálicos. (Krantz-Rülcker 2001; Winquist et al. 1997). Algunos artículos reportan el uso de iones metálicos y membranas poliméricas con el fin de mejorar la obtención de señales (Bratov et al. 2010). Adicionalmente, la información que se puede obtener a través de la voltamperometría es tan compleja que siempre son necesarios los métodos de calibración multivariada (Rachid et al. 2010).

Estos sensores emplean tres electrodos: de referencia, trabajo y auxiliar, donde el potencial del electrodo de referencia es constante por lo que el flujo de corriente ocurre entre el electrodo de trabajo y el electrodo auxiliar. La corriente generada es una función de la velocidad o grado de electrólisis, la cual es gobernada por el transporte de especies electroactivas de la muestra (por ejemplo: coeficiente de difusión, concentración de las especies).

El primer tipo de lengua electrónica voltamétrica fue desarrollado por Winqvist y se constituía de un conjunto de electrodos de trabajo de varios metales (Cu, Ni, Pd, Ag, Sn, Ti, Zr, Au, Pt), un electrodo de referencia y un electrodo auxiliar. Dependiendo de la aplicación, el conjunto total de electrodos de trabajo se dividía en subconjuntos. Fue posible entonces el reconocimiento de varios tipos de zumos de frutas y además diferenciar entre zumos naturales y aquellos preparados a base de concentrados (Winqvist et al. 1997). Se reporta por ejemplo la modificación de diferentes electrodos utilizando nanotubos de carbono cargados, polímeros, entre otros (Pioggia, Di Francesco, Marchetti, Ferro & Ahluwalia 2007; Pioggia, Di Francesco, Marchetti, Ferro, Leardi, et al. 2007). Existen algunos otros reportes en los que se hacen modificaciones utilizando membranas poliméricas mediante las cuales se obtienen señales relacionadas directamente con las sensaciones percibidas por la lengua de los mamíferos. (Kumar 2006).

Existen también otros tipos de sensores que se utilizan para obtener información útil de las muestras o procesos que se están evaluando.

▪ Otros sensores

La conductividad es la medida directa de la conductancia entre dos electrodos idénticos inertes. Este método es a menudo utilizado en combinación con la potenciometría, pues si se utiliza sólo, generalmente, puede generar información limitada (Krantz-Rülcker 2001). (Lavigne et al. 1998) propusieron un enfoque que se aparta de la electroquímica, ya que utilizaron granos de resina derivatizada con una variedad de moléculas de indicadores, también aprovechando sus propiedades de absorción de diferentes longitudes de onda e intensidades de luz (rojo, verde y azul) supervisado por medio de un dispositivo de carga acoplada. Este sistema era sensible a iones Ca^{++} a diferentes pH.

Adicionalmente, teniendo en cuenta las diferentes aplicaciones y reportes disponibles, se pueden encontrar algunas pautas generales (Oliveri et al. 2010) para el uso de la lengua:

- Evaluar cuidadosamente con herramientas quimiométricas el preprocesamiento de datos, con el fin de tener respuestas más adecuadas (correcciones de señal, transformaciones, compresión) y minimizar la cantidad de información no deseada.
- Iniciar siempre el reconocimiento de patrones realizando preliminarmente una exploración multivariada de los datos: el análisis de componentes principales (PCA) es una herramienta adecuada para este propósito, pues es útil para visualizar las estructuras (grupos, correlación) entre los datos y tomar decisiones acerca de los pasos de procesamiento posteriores.
- Utilizar las técnicas más simples posibles (posiblemente lineal y con pocas restricciones) para el modelado de datos, en lugar de aplicar las herramientas más complicadas: recurrir sólo a métodos más complejos, si los datos muestran estructuras complejas y las técnicas básicas no proporcionan resultados satisfactorios. Es decir, los métodos complejos generalmente requieren que se respeten muchas restricciones, y generalmente, una de las más importantes es que se tenga un número considerable de muestras.
- Realizar una validación correcta y extensa de modelos, con el fin de evaluar adecuadamente su capacidad de predicción y por lo tanto su aplicabilidad real. En particular, hay que tener en cuenta que si la construcción del modelo implica medidas de optimización, se puede aplicar una estrategia de validación en tres conjuntos.

1.6.3 Técnicas electroquímicas analíticas

A continuación se presentan algunas de las técnicas analíticas más utilizadas.

- **Voltametría cíclica**

La voltametría cíclica es la técnica más utilizada para la adquisición de información cualitativa de reacciones electroquímicas. Esta técnica es útil debido a que sus resultados pueden brindar rápidamente información importante acerca de la termodinámica de los procesos de óxido-reducción y la cinética de las reacciones de transferencia de electrones, o de procesos heterogéneos y de adsorción. Generalmente es el primer experimento que se lleva a cabo en los estudios electroanalíticos. Ofrece rápidamente la localización de los potenciales rédox de las especies electroactivas, y una evaluación conveniente del efecto de los medios de solución en el proceso rédox.

Esta técnica consiste en escanear linealmente el potencial de un electrodo de trabajo estacionario (en una solución sin agitar), usando una forma de onda de potencial triangular, como se presenta en la figura 1-1.

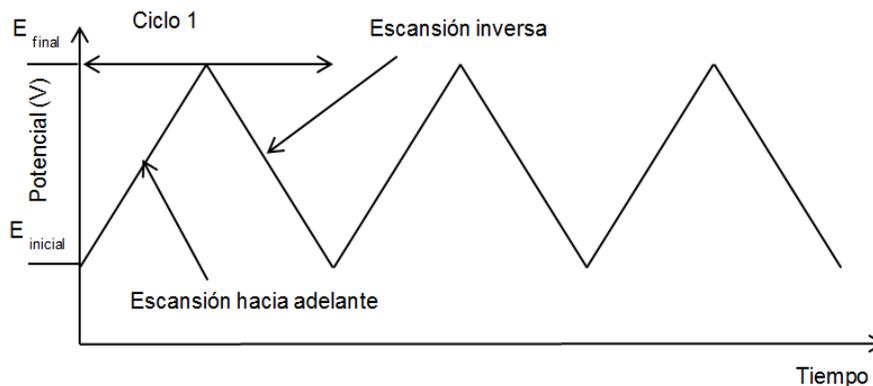


Figura 1-1. Señal de excitación potencial-tiempo en un experimento de voltametría cíclica (adaptada de (Wang 2000))

Dependiendo de la información que se requiere, se pueden utilizar ciclos individuales o múltiples. Durante el barrido de potencial, el potenciostato mide la corriente resultante del potencial aplicado. La gráfica de corriente contra potencial se denomina un voltamograma cíclico. El voltamograma cíclico es una función complicada, dependiente del tiempo y de un gran número de parámetros físicos y químicos.

En la figura 1-2 se presenta la respuesta esperada de un par rédox reversible durante un solo ciclo de potencial. Se supone que sólo la forma oxidada de O está presente inicialmente. Por lo tanto, se elige una escansión de potencial de sentido negativo para la primera mitad del ciclo, a partir de un valor donde no se produce reducción. A medida que el potencial aplicado se aproxima a E° característico para el proceso rédox, la corriente catódica comienza a aumentar, hasta que se alcanza un pico. Después de atravesar la región de potencial en el que el proceso de reducción se lleva a cabo (por lo menos $90/n$ mV más allá del pico), la dirección del barrido de potencial se invierte. Durante la exploración inversa, las moléculas de R (que se generan en el medio ciclo hacia adelante, y se acumulan cerca de la superficie) se vuelven a O, lo cual origina un pico anódico.

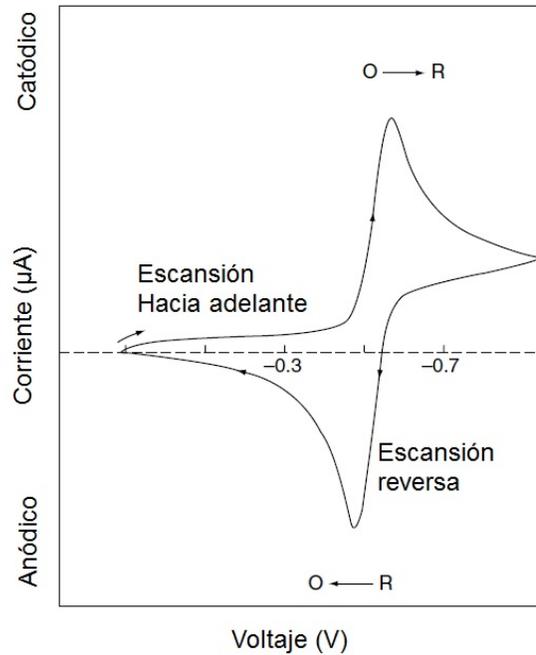


Figura 1-2. Voltamograma típico para un proceso redox $O + ne^- \rightarrow R$ (adaptada de (Wang 2000))

En la figura 1-3 se pueden observar las curvas para un sistema irreversible y uno parcialmente reversible. En las curvas de sistemas irreversibles, los picos son reducidos en alturas y más separados entre sí; por lo tanto, aquellos sistemas en los que hay comportamientos parcialmente reversibles, la separación entre los picos es mayor que la que se tendría en un sistema reversible.

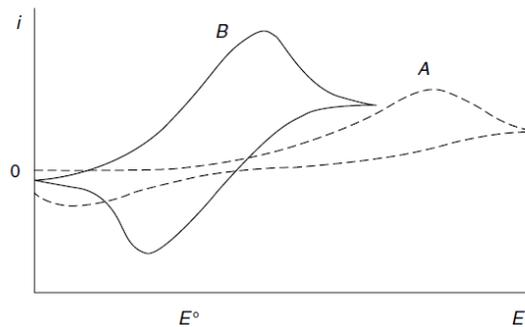


Figura 1-3. Voltamograma típico para un proceso irreversible (A) y parcialmente reversible (B) (tomada de (Wang 2000))

▪ Voltametría de Onda Cuadrada

Las técnicas de voltametría de pulso, están dirigidas a la reducción de los límites de detección de las mediciones voltamétricas. Estas técnicas permiten la cuantificación hasta el nivel de concentración de 10^{-8} M. Existen diferentes técnicas de pulso, las cuales se basan en el muestreo de corriente / potencial de paso (cronoamperometría); este muestreo es realizado en varios pasos de potenciales, cada uno con una duración máxima de 50 ms, los cuales se aplican sobre el electrodo de trabajo (Brett & Brett 1993).

La diferencia entre las diversas técnicas de voltametría de pulso es la forma de onda de excitación y el régimen de muestreo de la corriente. La voltametría de onda cuadrada es una técnica diferencial de gran amplitud en la que una onda cuadrada simétrica, superpuesta con un potencial de base escalera, se aplica sobre el electrodo de trabajo. La corriente se muestrea dos veces durante cada ciclo de la onda cuadrada, una vez al final del pulso hacia adelante (en el instante t_1) y una vez al final del pulso inverso (en el instante t_2). Puesto que la modulación de amplitud de la onda cuadrada es muy grande, los impulsos inversos causan la reacción inversa del producto (del pulso hacia adelante), (Wang 2000).

La diferencia entre las dos mediciones se representa gráficamente frente al potencial de base escalera. En la figura 1-4 se puede observar cómo varía el voltaje a lo largo del tiempo para esta técnica. En la figura 1-5 se presenta la variación de la corriente contra el voltaje para transferencia de electrones reversible: corriente hacia adelante (A), corriente inversa (B) y corriente neta (C). En estos casos, el pico de corriente observado es proporcional a la concentración; esta técnica presenta una sensibilidad alta.

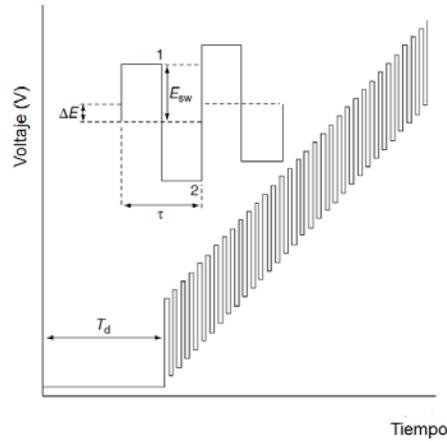


Figura 1-4. Forma de la onda cuadrada en la cual se muestra la amplitud, el paso de altura, el período y el tiempo de retardo (tomada y adaptada de (Wang 2000)).

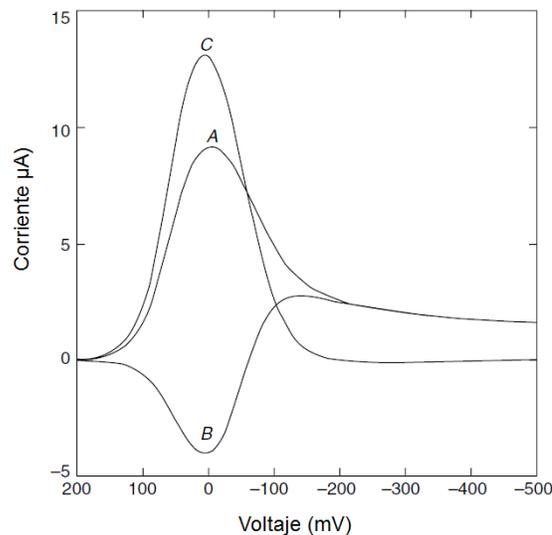


Figura 1-5. Variación de la corriente contra el voltaje para transferencia de electrones reversible: corriente hacia adelante (A), corriente inversa (B) y corriente neta (C) (tomada y adaptada de (Wang 2000)).

1.6.4 Aplicaciones en diferentes industrias

En el Anexo D se presentan algunas de las aplicaciones más relevantes que se encuentran reportadas acerca del empleo de las lenguas electrónicas. En general, los diferentes artículos revelan que la combinación de matrices de sensores y análisis de datos multivariado, se convierte en una herramienta poderosa para el control de calidad en

diferentes campos. Se encuentran obviamente gran número de publicaciones en las que se reporta el uso de sistemas de gusto artificial para la caracterización de diferentes matrices alimenticias, tales como productos lácteos, cerveza y miel, así como el seguimiento de procesos fermentativos (Esbensen et al. 2004; Arrieta et al. 2010; Dias et al. 2008; Hruškar et al. 2009). Dentro de las aplicaciones reportadas que más se relacionan con el tema de esta tesis, se encuentran aquellos relacionados con el análisis de vinos, especialmente gran número de publicaciones acerca de la clasificación de vinos (Gutiérrez, Domingo, et al. 2011; Gutiérrez, Llobera, et al. 2011; M. Gutiérrez et al. 2010; J. M. Gutiérrez et al. 2010; Buratti et al. 2007; Parra, Arrieta, J.-A. Fernández-Escudero, et al. 2006; Parra, Arrieta, J. a. Fernández-Escudero, et al. 2006; Rong 2000; Gay et al. 2010; Legin 2000; Moreno i Codinachs et al. 2008; Lvova, Paolesse, et al. 2006; Lvova, Martinelli, et al. 2006; Cetó et al. 2011; Novakowski et al. 2011; Schmidtke et al. 2010; Prieto et al. 2011; Pigani et al. 2011). También hay otras relacionadas con el sabor amargo de los vinos y el contenido de compuestos fenólicos (Rudnitskaya et al. 2010; Cetó, Céspedes, Pividori, et al. 2012; Cetó, Céspedes & del Valle 2012; Cetó et al. 2013), añejamiento (Gay et al. 2010; Rudnitskaya et al. 2009; Parra, Arrieta, J. a. Fernández-Escudero, et al. 2006; Rudnitskaya et al. 2010; Rudnitskaya et al. 2007), así como diferentes bebidas alcohólicas (Arrieta et al. 2010; Lvova, Paolesse, et al. 2006; Wei et al. 2011; Ouyang et al. 2013). Existen algunas publicaciones acerca de la oxidación de vinos y vida útil (Prieto et al. 2011; Gil-Sánchez et al. 2011), así como sobre el monitoreo del proceso fermentativo (Buratti et al. 2011).

Se encuentran pocos reportes referentes a la evaluación de productos apícolas, en específico de la miel. Dichos reportes tienen en cuenta la aplicación de instrumentos de gusto artificial para la clasificación de mieles (Dias et al. 2008; Escriche et al. 2012) y evaluación de la calidad de las mismas (Tiwari & Tudu 2012; Tiwari et al. 2013).

Es importante resaltar que con la revisión bibliográfica realizada, se encuentra que las lenguas electrónicas son herramientas eficaces para el análisis, capaces de caracterizar muestras a través de un enfoque no específico, y que pueden proporcionar información útil para muchos propósitos, lo que permite aplicaciones tanto cualitativas como cuantitativas (Oliveri et al. 2010) (Winqvist 1999).

Con base en los antecedentes consultados, se puede decir que no existe una lengua electrónica que pueda ser aplicada en el monitoreo de procesos fermentativos, y específicamente al proceso de obtención de bebida alcohólica de miel; por lo tanto, se

quiere desarrollar un sistema instrumental de gusto artificial que permita llevar a cabo el seguimiento de fermentaciones etanólicas para la obtención de hidromiel, utilizando una levadura comercial, con el cual se puedan establecer relaciones a lo largo del tiempo de variables fisicoquímicas tradicionales como grados Brix, grados alcohólicos, porcentaje de acidez total, contenido de ácidos orgánicos, contenido de alcohol y de azúcares y las variables sensoriales obtenidas mediante un panel entrenado con el fin de evaluar el comportamiento cinético de la fermentación etanólica.

2. Materiales y Métodos

A continuación se presentan los principales materiales y métodos utilizados para la realización de este trabajo.

2.1 Materias primas

Se utilizaron diferentes materias primas para llevar a cabo los ensayos a lo largo de este proyecto. Entre ellas se encuentran:

2.1.1 Miel

Se utilizaron tres tipos diferentes de miel.

Miel colombiana cristalizada y multifloral, proveniente de la región de Boyacá, la cual fue, obtenida de la asociación regional de apicultores Asoapiboy.

Miel comercial colombiana marca Abeja Dorada. Fue comprada en el mercado local y es proveniente de la región de Cundinamarca.

Miel italiana multifloral proveniente de la región de Alto Adige, Bolzano, obtenida en el mercado local.

2.1.2 Agua

Se utilizó agua potable proveniente del acueducto de Bogotá para los ensayos en Colombia y del acueducto de Bolzano y Milán para los ensayos en Italia.

2.1.3 Polen

Para los ensayos en Colombia se utilizó polen proveniente de la región de Boyacá, obtenido de la asociación de apicultores Asoapiboy. Para los ensayos en Italia, se utilizó polen del Alto Adige, comprado en el mercado local.

2.1.4 Levadura

Para todos los ensayos se utilizó levadura comercial para vino blanco *Saccharomyces cerevisiae subsp. bayanus* de Lallemand, suministrada por Interenzimas.

2.1.5 Azúcar

Para los ensayos de fermentación con miel adulterada, se utilizó azúcar blanca comercial de Manuelita, adquirida en el mercado local.

2.1.6 Hierbas, frutas y especias

Se adicionaron diferentes hierbas, frutas y especias para cambiar las características sensoriales del hidromiel.

Como hierbas se utilizaron limonaria (*Cymbopogon citratus*), yerbabuena (*Mentha spicata*) y canela (*Cinnamomum verum*), obtenidas en el mercado local colombiano.

Se emplearon frutos rojos locales tales como corozo (*Bactris minor*) y agraz (*Vaccinium floribundum HBK*) adquiridos en el mercado local colombiano.

Como especias se usaron clavo (*Eugenia caryophyllata*) y ají (*Capsicum annum*) adquiridos en el mercado local italiano.

2.1.7 Hidromieles comerciales

Se adquirieron diez y nueve hidromieles comerciales en diferentes lugares con el fin de ser evaluadas utilizando diferentes técnicas analíticas. En la tabla 2-1 se pueden ver las diferentes clases de hidromieles comerciales evaluadas.

Tabla 2-1 Diferentes hidromieles comerciales evaluadas

Código	Nombre	Tipo	Origen	Tipo de elaboración	Contenido alcohol
1	Aqua melis	Hidromiel semiseco	España	Artesanal	12,5%
2	Liquor d'melis	Hidromiel	España	Artesanal	15,5%
3	Medovina váocní	medovinka.eu		Artesanal	13%
4	Hidromiel del viejo san marcos	seca	Argentina	Artesanal	14°
5	Idromele Morfeo		Italia	Artesanal	12%
6	Medovina	Sorká Mandlová		Artesanal	18%
7	Aqua melis	Hidromiel Dúlce	España	Artesanal	14%
8	Chouchen	Fermento de Miel Con Fiori di Sambuco de Acacia	Italia	Artesanal	14%
9	Agrupamento de Produtores Mel do Parque, LTDA	Licor de Mel	Brasil	Artesanal	No aplica
10	Apiarios Gota de Oro	Vino de Miel	Colombia	Artesanal	No aplica
11	"Il netlase degli dei" azienda agricola massimo barbiero	Idromele	Italia	Artesanal	13%
12	Sagra vanir placer adulto	Hidromiel	España	Artesanal	11%
13	Chimeré IDROMELE	Bevanda alcolica a base de miele Gran Riserva	Italia	Artesanal	14%
14	Azienda agricola massimo barbiero	Idromele Artigianale a base di melata di abete	Italia	Artesanal	14%
15	Chimeré idromele	Bevanda alcolica a base di miele Gran riserva	Italia	Artesanal	14%
16	Chimeré idromele	Bevanda alcolica a base di miele Corbezzolo	Italia	Artesanal	14%
17	Chimeré idromele	Millefiori	Italia	Artesanal	14,5%
18	Lurgashall	English Honey Mead	Inglaterra	Artesanal	12.5%
19	Lurgashall	Dry Honey Mead	Inglaterra	Artesanal	15%

2.1.8 Reactivos y soluciones

Todos los reactivos químicos utilizados para llevar a cabo HPLC fueron grado HPLC, provenientes de Sigma–Aldrich. Todas las soluciones se prepararon utilizando agua desionizada utilizando un MilliQ Academic marca Millipore.

2.2 Condiciones de fermentación

Para todas las fermentaciones se llevó a cabo un proceso similar. Inicialmente se preparó el mosto mediante dilución de la miel utilizando agua proveniente del acueducto hasta alcanzar 24 °Brix; posteriormente se adicionó polen como fuente de nitrógeno en una relación de 4 g/kg de mosto y los modificadores sensoriales explicados en el numeral 2.1.6 en los casos en los que así se requirió. Posteriormente, se pasterizó el mosto por 15 minutos a 65°C y después se enfrió a 37°C, se tomó un volumen correspondiente al 10% del volumen de la fermentación con el fin de activar la levadura, adicionando 0.4 g de levadura /kg de mosto.

En la Figura 2-1 se muestra el diagrama de proceso para todas las fermentaciones. Se utilizó una cámara con control de temperatura por tres semanas a 25°C, y las muestras se tomaron a lo largo del tiempo con el fin de llevar a cabo el seguimiento de diferentes variables, tales como grados Brix, acidez, pH, densidad, contenido de glucosa, fructosa, etanol y glicerol, así como las mediciones sensoriales y las del sistema de gusto artificial.

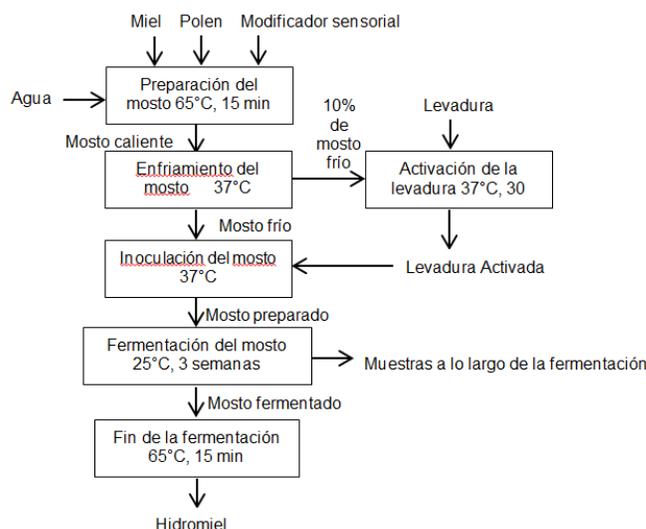


Figura 2-1 Diagrama de proceso de fermentación

2.3 Análisis fisicoquímicos

Con el fin de llevar a cabo el seguimiento de los procesos fermentativos y la caracterización de los productos analizados, se llevó a cabo la determinación de diferentes variables fisicoquímicas que se mencionan a continuación:

2.3.1 Porcentaje de sólidos solubles

Se evaluó por refractometría, de acuerdo con el Método OIV-MA-AS2-02. Se utilizaron refractómetros portátiles marca SinoTech Ref RSG-100/ATC (0 a 32 °Brix) y RHB-90ATC (58 a 90 °Brix).

2.3.2 Acidez Total

Se realizó valoración potenciométrica con un potenciómetro comercial Schott. Handylab pH11 /SET, por el Método 950.15 AOAC, 2005. Para ello, se utilizó una solución estandarizada de NaOH 0.1 M, preparada a partir de hidróxido de sodio en lentejas al 98% marca Panreac. Esta acidez se expresó como porcentaje de ácido málico, en relación peso a volumen, según lo contenido en los reglamentos de la Unión Europea C 266/27, C 268/22, C 267/40 y C 265/29 de Noviembre 7 de 2007. También puede expresarse en gramos de ácido tartárico por litro debido a que es el ácido que principalmente está contenido en las uvas, materia prima principal para la obtención de vino, de acuerdo con lo establecido en la NTC 708. La diferencia en los valores calculados obtenidos es del 11%, debido a que un equivalente de ácido tartárico pesa 75 g y uno de ácido málico 67 g.

2.3.3 Actividad Antioxidante

Es la capacidad de una sustancia para inhibir la degradación oxidativa, la cual corresponde a la exposición de material celular a diversos mecanismos antioxidantes causando una alteración de la estructura y la función de cualquier célula (Venereo Gutiérrez, 2002). Existen métodos directos o indirectos para su determinación.

En los métodos indirectos se mide la habilidad de las sustancias antioxidantes para estabilizar algún radical libre. Los métodos directos están basados en el estudio del efecto de un antioxidante sobre la degradación oxidativa de un sistema, de los cuales los más

usados han sido: proteínas, ácidos nucleicos, plasma sanguíneo, grasas, lipoproteínas, membranas biológicas, entre otros.

Debido a que no existe un acuerdo para reportar la actividad antioxidante de diferentes matrices, ésta debe medirse al menos por tres metodologías diferentes, con el fin de que los resultados tengan alguna validez desde el punto de vista analítico, y puedan ser comparados con diferentes reportes. Algunos de estos métodos se describen a continuación:

▪ **Método de Folin-Ciocalteu.**

La actividad antioxidante generada por compuestos fenólicos se determina por oxidación directa del reactivo de Folin-Ciocalteu. Este reactivo se forma a partir de una mezcla de ácido fosfotúngstico, $H_3PW_{12}O_{40}$, y ácido fosfomolibdico, $H_3PMo_{12}O_{40}$, que, después de la oxidación de los fenoles presentes en la muestra, se reduce a una mezcla de óxidos azules de tungsteno, W_8O_{23} , y molibdeno, Mo_8O_{23} que puede ser determinada por espectrofotometría a 760 nm (Agudo, 2012).

Este complejo azul tiene su máxima absorción dependiendo de la composición fenólica, además del pH de las soluciones implicadas. Por ello, se emplea un búfer de carbonato para ajustar el pH de modo que el punto final de la reacción se alcance alrededor de los 120 minutos a temperatura ambiente.

La determinación espectrofotométrica es contrastada contra una curva de calibración de diferentes puntos de concentración conocida de algún compuesto fenólico de referencia, usualmente ácido gálico, de tal manera que los resultados se expresan en equivalentes de ácido gálico (EGA). Sin embargo, múltiples trabajos han utilizado igual variedad de estándares, entre los que se cuentan: catequina, ácido tánico, ácido clorogénico, ácido caféico, ácido protocatecúico y ácido ferúlico, lo cual dificulta la comparación entre muestras, además de las variaciones que implica la no estandarización del método en cuanto a condiciones críticas como proporciones de reactivos, temperatura y tiempo de lectura (Londoño, 2012).

- **Método FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power).**

Se basa en la determinación de la reducción del complejo incoloro 2,4,6-tripiridiltriazina férrica (TPTZ) a un complejo ferroso coloreado, el cual permite la detección de compuestos con potenciales rédox < 0.7 V. Esta metodología fue concebida para el análisis de plasma, pero en la actualidad se utiliza para diferentes matrices y sustancias puras (I. F. F. Benzie & J. J. Strain, 1996).

Es un método espectrofotométrico pues se determina la absorbancia del Fe^{2+} . Así, se relaciona el contenido de antioxidantes con la reducción, y por tanto, con la mayor concentración de Fe^{2+} , obteniéndose una señal más alta utilizando una longitud de onda de 593 nm.

Diariamente se debe preparar la solución de TPTZ, solución de cloruro férrico y solución búfer de acetato (0,3 mM, pH 3.6) en proporción 1:1:10 respectivamente. La curva de calibración se realiza generalmente con disoluciones patrón de Trolox (Agudo, 2012) o de sulfato de hierro como lo propone el método originalmente publicado (I. F. F. Benzie & J. J. Strain, 1996), (Kriman, House, Vásquez, & Rodrigo, 2011), (Moniruzzaman, Khalil, Sulaiman, & Gan, 2012).

- **Método ABTS.**

Se basa en la capacidad de un antioxidante para estabilizar el radical catión coloreado $ABTS^{*+}$, el cual se forma previamente por la oxidación del ABTS (2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico)); este puede ser reducido por compuestos que tengan un potencial rédox menor que el del ABTS (0.68V).

Inicialmente se debe producir *in situ* el radical $ABTS^{*+}$, el cual presenta un color verde-azul; dicho radical se obtiene mediante la reacción entre ABTS y el persulfato de potasio ($K_2S_2O_8$); posteriormente se lleva a cabo la cuantificación teniendo en cuenta tres longitudes de onda de absorción: 645 nm, 734 nm y 815 nm. Cuando el radical entra en contacto con los compuestos antioxidantes contenidos en una muestra, éste es reducido nuevamente a ABTS; se va decolorando dicha solución, y esta decoloración se cuantifica como porcentaje de inhibición del radical catiónico. Los resultados son expresados como equivalentes de Trolox con la correspondiente curva de calibración bajo las mismas condiciones.

Entre las ventajas del método está que permite la evaluación de antioxidantes hidrofílicos y lipofílicos en un amplio rango de pH. Su principal desventaja es que su cinética de reacción suele ser muy lenta y muchas veces el punto final de la reacción se fija de forma arbitraria.

2.3.4 Determinación de azúcares y alcoholes

Se empleó la técnica de cromatografía de alta eficiencia (HPLC) para determinar glucosa, fructosa, glicerol y etanol presentes en el medio de fermentación. La muestra se preparó tomando 15 mL de muestra y centrifugándola a 4500 rpm durante 10 minutos, con el fin de precipitar los sólidos insolubles. Una vez retirados los sólidos, del sobrenadante se tomaron 500 μL , los cuales se diluyeron en agua desionizada y llevando a volumen en un balón aforado de 25 mL. Se tomaron 3 mL del sobrenadante con una jeringa y se filtraron por una membrana de 0,22 μm . Se tomaron 1000 μL de esta solución filtrada y posteriormente, se utilizó el automuestreador para inyectar en el cromatógrafo marca Jasco modelo 2000 y realizar la determinación de la glucosa, fructosa, glicerol y etanol. La columna empleada fue una Sugar-Pak I marca Waters y la fase móvil, agua desionizada y desgasificada. Las condiciones de operación del equipo se presentan en la tabla 2-2.

Tabla 2-2 Condiciones de operación del cromatógrafo para determinación de azúcares y alcoholes

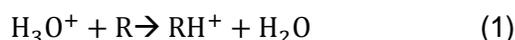
Condición	Valor
Flujo de fase móvil (agua)	0.5 mL/min
Temperatura del detector	40°C
Temperatura de la columna	80°C
Detector empleado	Refractometría diferencial
Volumen de muestra	20 μL
Tiempo de residencia glucosa	9.8 minutos
Tiempo de residencia fructosa	11.3 minutos
Tiempo de residencia glicerol	13.7 minutos
Tiempo de residencia etanol	14.4 minutos

2.3.5 Determinación del perfil de compuestos volátiles usando PTR-MS

La espectrometría de masa de reacción de transferencia de protones (PTR-MS) es una técnica muy sensible para el monitoreo en línea de compuestos volátiles orgánicos en aire, creada por científicos del Instituto para la Física Iónica en la Universidad Leopold-Franzens de Innsbruck, Austria (Lindinger et al. 1998).

Un instrumento PTR-MS consta de una fuente de iones que está directamente conectada a un tubo de descarga (sin filtro de masas interconectado) y un sistema de análisis (analizador de masas cuadrupolo o espectrómetro de masas de tiempo de vuelo). En el mercado se encuentran disponibles instrumentos que tienen un tiempo de respuesta de alrededor de 100 ms y alcanzan un límite de detección en la región pptv (partes por trillón volumétricas). Este tipo de instrumento permite realizar investigaciones en diferentes campos tales como medio ambiente, alimentos, industria de aromas y fragancias, biología, medicina, etc. (Lindinger et al. 2005).

En esta técnica analítica el H_3O^+ es el ion primario; el proceso de transferencia de protones es el que se presenta en la ecuación (1) (siendo R el componente traza):



Esta reacción sólo es posible si energéticamente la afinidad protónica de R es mayor que la afinidad protónica del agua (691 kJ/mol). La mayoría de los componentes del aire poseen una afinidad protónica menor que la del agua (por ejemplo, N_2 , O_2 , Ar, CO_2 , etc.), y el ión H_3O^+ sólo reacciona con los componentes volátiles orgánicos. Así, el aire actúa como un gas búfer y permite la generación de un perfil de diferentes masas m/z que se relacionan con los componentes volátiles contenidos en las muestras. Por otra parte, debido al bajo número de componentes traza puede suponerse que el número total de iones H_3O^+ se mantiene casi sin cambios, lo que conduce a la ecuación (2):

$$[\text{RH}^+] = [\text{H}_3\text{O}^+]_0 (1 - e^{-kRt}) = [\text{H}_3\text{O}^+]_0 [\text{R}]kt \quad (2)$$

En la ecuación (2) $[\text{RH}^+]$ es la densidad de iones producidos, $[\text{H}_3\text{O}^+]_0$ es la densidad de iones primarios en ausencia de moléculas reactivas en el gas búfer, k es la constante de velocidad de reacción y t es el promedio de tiempo que los iones necesitan para pasar a la zona de reacción (Lindinger et al. 1998).

En los instrumentos comerciales, el vapor de agua se ioniza en una descarga en el cátodo hueco; después de la descarga, se utiliza un tubo para formar H_3O^+ muy puro a través de reacciones moleculares. Debido a la alta pureza de los iones primarios no es necesario un filtro de masas entre el tubo y la fuente de iones; como este filtro no está presente, se reduce la pérdida de iones primarios y por ende el límite de detección del instrumento es

pequeño. En el tubo de reacción, hay una bomba de vacío que conduce los compuestos volátiles que se deben analizar, y al final se analiza la masa de las moléculas protonadas. En la Figura 2-2 se puede observar un esquema del instrumento:

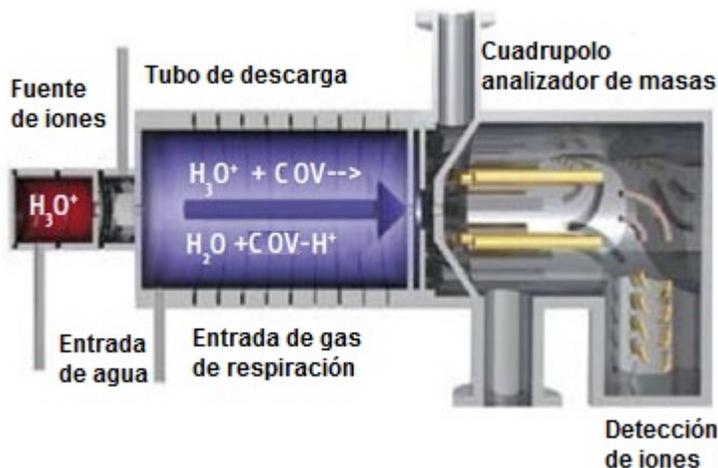


Figura 2-2 Esquema del PTR-MS (Tomado y adaptado de (HelmholtzZentrum 2014))

Dentro de las ventajas que presenta esta técnica están: la baja fragmentación de los componentes de la muestra, no se requiere preparación de la muestra, se puede medir y cuantificar en tiempo real, su arranque es robusto y es fácil de operar. También presenta algunas desventajas, tales como que no son detectables todas las moléculas, la concentración máxima detectable es limitada, pues no puede exceder las 10 ppm, pero esto se puede solucionar haciendo una dilución, empleando aire puro (Biasioli et al. 2011).

En la Figura 2-3 se presenta la manera en la que la muestra es suministrada al equipo

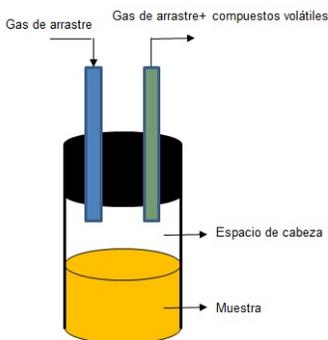


Figura 2-3 Esquema de toma de muestra utilizando el PTR-MS

Las determinaciones de las muestras se realizaron con un espectrómetro comercial de alta sensibilidad de masas (hs-PTR-MS), marca Ionicon Analytik, ubicado en el Centro de

Investigación de Agricultura y Silvicultura Laimburg, de la Provincia de Bolzano (Italia). Las intensidades de las señales detectadas por PTR-MS se normalizaron a la señal primaria de iones (H_3O^+). Se calcularon los valores medios de las intensidades de señal desde los ciclos 6 al 10 para cada masa en el rango de m/z 20 a m/z 200. Sólo se utilizaron las señales que mostraron una intensidad mínima de 500 recuentos normalizados por segundo (PCN), en por lo menos una de las muestras analizadas. Los datos fueron normalizados y los cálculos de las medias se realizaron utilizando Microsoft Excel versión 2010. Los análisis de varianza (ANOVA) y análisis de componentes principales (PCA) se realizaron con Matlab versión 9.0. Antes del ANOVA, se realizó un test de Levene para evaluar la homogeneidad en cuanto a variación, de acuerdo con lo planteado por (Spitaler et al. 2007).

En la figura 2-4 (a) y (b) se pueden observar fotografías del sistema utilizado

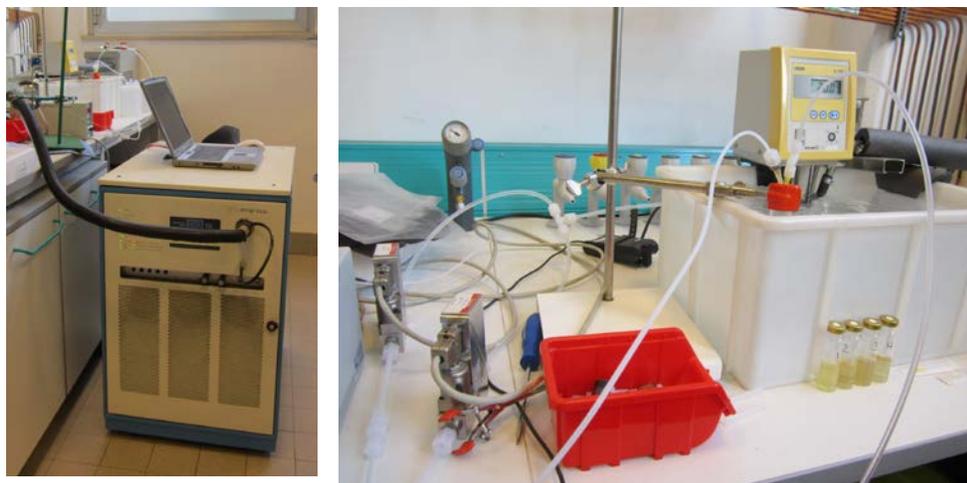


Figura 2-4 (a) Fotografía del sistema PTR-MS marca Ionicon (a) y de las conexiones auxiliares (b), Laimburg, Italia

2.3.6 Evaluación de diferentes muestras mediante FTIR-ATR

La espectrometría infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) es una técnica que proporciona un espectro de la luz reflejada de las bandas de los grupos funcionales de las sustancias inorgánicas y orgánicas, por lo cual es posible realizar una identificación de diversos materiales (Gallardo-Velázquez et al. 2009; Arida et al. 2012). Es un método de toma de huella dactilar (finger print) extremadamente confiable y reconocido (Luykx & van

Ruth 2008). Con este tipo de mediciones se pueden caracterizar, identificar y cuantificar muchas matrices. Una de las ventajas de la espectroscopía infrarroja es su capacidad para obtener espectros de una gama muy amplia de sólidos, líquidos y gases. Sin embargo, en muchos casos la muestra requiere alguna forma de preparación con el fin de obtener un espectro de buena calidad.

Tradicionalmente los espectrómetros infrarrojos se han utilizado para analizar sólidos, líquidos y gases por medio de la transmisión de la radiación infrarroja directamente a través de la muestra. Cuando la muestra está en una forma líquida o sólida, la intensidad de las características espectrales se determina por el espesor de la muestra y típicamente este es de unas pocas micras.

La técnica de reflectancia total atenuada (ATR) en los últimos años revolucionó el análisis de muestras sólidas y líquidas porque no es necesaria la preparación de la muestra y la reproducibilidad espectral es adecuada. Un accesorio de reflexión total atenuada opera mediante la medición de los cambios que se producen en un haz de luz infrarroja totalmente reflejada internamente cuando el haz entra en contacto con una muestra (Rudnitskaya et al. 2006; Beullens et al. 2006). Su funcionamiento se basa en que un haz de infrarrojo se dirige sobre un cristal ópticamente denso con un alto índice de refracción en un ángulo determinado. Esta reflectancia interna crea una onda evanescente que se extiende más allá de la superficie del cristal en la muestra, la cual se mantiene en contacto con el cristal. Esta onda evanescente puede imaginarse como una burbuja de infrarrojos que se encuentra en la superficie del cristal. Esta onda evanescente sobresale sólo unas pocas micras (0,5 - 5 μm) más allá de la superficie del cristal y en la muestra. Por ello, debe haber un buen contacto entre la muestra y la superficie del cristal.

En las regiones del espectro infrarrojo, donde la muestra absorbe la energía, la onda evanescente será atenuada o alterada. La energía atenuada de cada onda evanescente se pasa de nuevo al haz infrarrojo, que luego sale por el extremo opuesto del cristal y se pasa al detector en el espectrofotómetro de IR (PerkinElmer 2005). El sistema genera entonces un espectro infrarrojo. Esto sucede si la muestra está en contacto directo con el cristal de ATR, debido a que la onda evanescente sólo se extiende más allá del cristal de 0,5 - 5 μm , y el índice de refracción del cristal debe ser significativamente mayor que la muestra o bien

la reflectancia interna no se producirá (de lo contrario, la luz se transmite en vez de ser reflejada internamente en el cristal). Normalmente, los cristales ATR tienen valores de índice de refracción entre 2,38 y 4,01 en 2000 cm^{-1} . Es importante tener en cuenta que la mayoría de los sólidos y los líquidos tienen índices de refracción mucho más bajos (PerkinElmer 2005).

Al igual que con todas las mediciones de FTIR, se debe determinar el ruido (background) del infrarrojo con el cristal de ATR limpio. Estos cristales generalmente se limpian con un pañuelo desechable sin fibras empapado de disolvente (agua, metanol o isopropanol). En la Figura 2-5 se puede observar un esquema del funcionamiento de esta técnica:

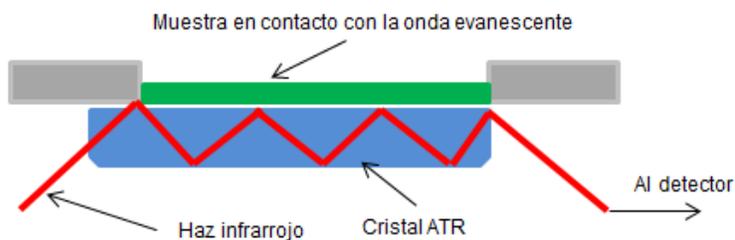


Figura 2-5 Esquema de funcionamiento del FTIR-ATR (Tomado y adaptado de (PerkinElmer 2005))

Para todas las determinaciones realizadas, se utilizó un espectrómetro infrarrojo con ATR marca Bruker modelo Tensor 27 FT-IR serial 3011, con software Opus Connection para adquisición de datos, ubicado en los laboratorios de la Facultad de Ciencia y Tecnología de la Universidad Libre de Bolzano (Italia).

Las determinaciones se llevaron a cabo a 25°C . Las muestras analizadas en todos los casos fueron líquidas, poniendo $10\ \mu\text{L}$ sobre el cristal. Se llevaron a cabo 32 determinaciones por cada muestra entre 4000 y 400 cm^{-1} . Se utilizó como solventes de limpieza agua desionizada y etanol. En la figura 2-6 se presentan fotografías del sistema utilizado.



(a) (b)
Figura 2-6 Fotografía del sistema FTIR ATR marca Bruker (a) y detalle del portamuestra (b), utilizado, Bolzano, Italia

2.3.7 Espectroscopía UV-Visible

Es una técnica analítica que utiliza radiación electromagnética (luz) de las regiones visible, ultravioleta cercana (UV) e infrarroja cercana (NIR), con longitudes de onda entre 180 nm y 780 nm. La radiación absorbida por las moléculas en esta región del espectro provoca transiciones electrónicas que pueden ser cuantificadas.

Esta técnica se emplea para identificar algunos grupos funcionales de moléculas, y además, para determinar el contenido de una sustancia. Se utiliza de manera general en la determinación cuantitativa de los componentes de soluciones de iones de metales de transición y compuestos orgánicos altamente conjugados.

Para realizar las mediciones, se utilizó un espectrofotómetro marca Agilent Technologies modelo Carry 100 con control de temperatura y software Carry 100 para la adquisición de datos, ubicado en los laboratorios de la Facultad de Ciencia y Tecnología de la Universidad Libre de Bolzano (Italia). Todas las mediciones se llevaron a cabo a 25°C. Para todas las muestras se llevaron a cabo determinaciones utilizando las muestras en una dilución con agua desionizada en una relación 1:20; se tomaron 1000 μL de esta solución y se puso en celdas marca Plastibrand de polimetilmetacrilato de volumen máximo de 1500 μL . Las

longitudes de onda utilizadas fueron 280 nm y 267 nm, ya que en la zona visible no se observaron picos. En la figura 2-7 se presenta la fotografía del sistema utilizado.



Figura 2-7 Fotografía del espectrofotómetro marca Agilent con control de temperatura utilizado

2.4 Análisis sensorial

Para el análisis sensorial, se realizaron pruebas descriptivas, de acuerdo con lo explicado en el numeral 1.4.2. Con lo establecido en la Tabla 1-1, se llevaron a cabo pruebas de escala y perfil con el fin de evaluar los hidromieles comerciales y la cinética de fermentación. En el Anexo E se presenta el formulario utilizado para la realización de la evaluación.

2.5 Sistema de gusto artificial

El sistema construido en Colombia, el cual fue conformado por diferentes insumos comerciales, fue comparado con un sistema comercial disponible en Italia; se llevaron a cabo diferentes análisis instrumentales utilizando diferentes dispositivos en Colombia e Italia.

Las determinaciones electroquímicas se llevaron a cabo utilizando procedimientos empleando técnicas de voltametría cíclica y de onda cuadrada, utilizando sensores comerciales y modificados (Wang 2000). Generalmente, siempre se utiliza una sustancia búfer o solución de referencia electroquímica, la cual debe comportarse estable al aplicarse

los diferentes potenciales de trabajo; esta señal obtenida constituye la línea base para las demás determinaciones realizadas; las señales obtenidas son señales de corriente (obtenidas en microamperios). En las figuras 2-8 y 2-9 se pueden observar voltamogramas tipo para voltametría cíclica y voltametría de onda cuadrada, respectivamente. Generalmente, se hace primero la evaluación de la solución búfer. Posteriormente, se adiciona una cantidad determinada de muestra (del orden de microlitros) en una cantidad determinada de búfer (del orden de mL); se ve entonces la diferencia de corriente que existe entre ambas respuestas. Adicionalmente, en la figura 2-10 se presenta el resultado gráfico que se obtiene a partir de la figura 2-9, en la cual se observa el pico correspondiente a la diferencia de corriente para la muestra evaluada. De esta manera se pueden tener los diferentes voltamogramas a lo largo del tiempo para las diferentes muestras que pueden analizarse con el fin de evaluar diferentes tipos de soluciones, y a medida que avanza el tiempo para llevar a cabo el monitoreo de la fermentación o diferentes tipos de muestras con el fin de llevar a cabo la clasificación de las mismas.

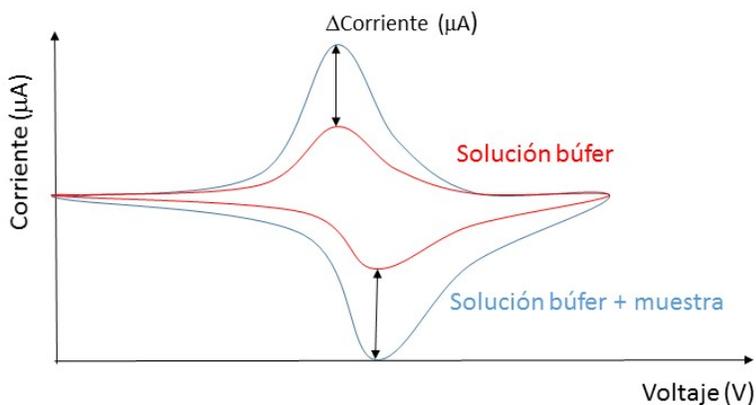


Figura 2-8 Voltamograma modelo de voltametría cíclica

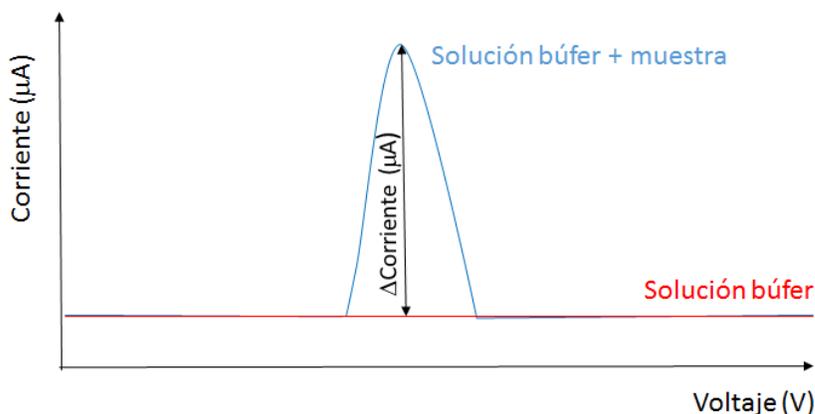


Figura 2-9 Voltamograma modelo de voltametría de onda cuadrada



Figura 2-10 Diferencia de corriente para voltametría de onda cuadrada

2.5.1 Determinaciones electroquímicas realizadas (Italia)

Para este tipo de determinaciones se utilizó un potenciostato marca Metrohm modelo Autolab PGSTAT128N, el cual tiene un diseño modular y permite hacer mediciones voltamétricas diferentes. Permite hacer mediciones en celdas pequeñas, y usa el software de adquisición de datos Nova, donde se puede programar la adquisición de los datos utilizando diferentes técnicas analíticas. La adición de la muestra se hizo de forma manual. Este equipo se encuentra ubicado en los laboratorios de la Facultad de Ciencia y Tecnología de la Libre Universidad de Bolzano. En la figura 2-11 se presenta una fotografía del equipo empleado.

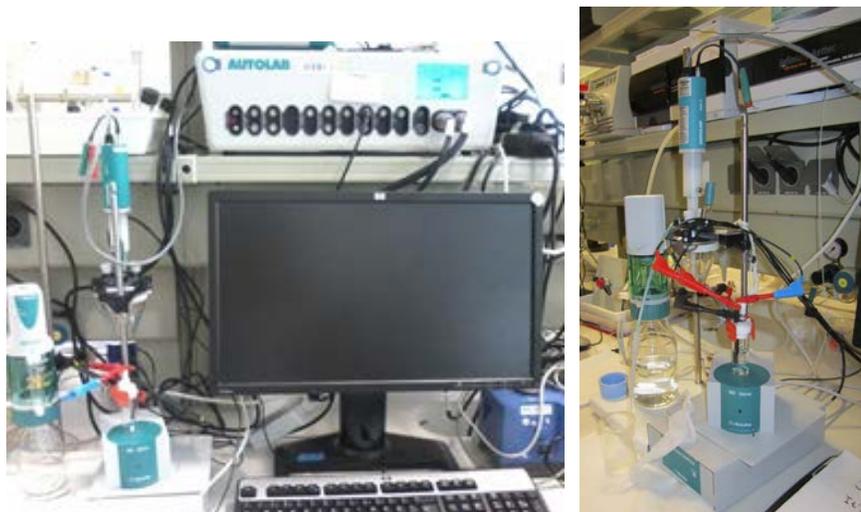


Figura 2-11 Fotografía sistema electroquímico marca Metrohm, Bolzano, Italia

En este sistema, se utilizó como electrodo de trabajo un electrodo de carbón vítreo de diámetro 3 mm, como el que se presenta en la figura 2-12, (glassy carbon, o carbón vítreo), marca Basi Inc., los cuales también fueron modificados con cobre y nanotubos de carbono

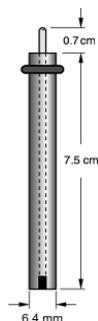


Figura 2-12 Esquema de electrodo de carbón vítreo utilizado en el sistema marca Metrohm

2.5.2 Determinaciones electroquímicas realizadas con la herramienta de gusto artificial (Colombia)

De acuerdo con lo establecido en el numeral 1.5.3, las técnicas utilizadas en los diferentes ensayos realizados fueron la voltametría cíclica y la voltametría de onda cuadrada, las cuales permiten llevar a cabo la caracterización de las diversas muestras evaluadas, tanto soluciones modelo, como muestras reales. La construcción del sistema de gusto artificial se llevó a cabo realizando inicialmente la selección de sensores, solución búfer y finalmente llevando a cabo la modificación de los sensores.

El sistema utilizado fue un potenciostato MultiEmstat de cuatro canales adquirido a PalmSens (Holanda), que utiliza como programa de adquisición de datos Multitrace 1.4 PStTrace 3.0. Los sensores comerciales utilizados eran microelectrodos desechables (screen printed electrodes) provenientes de BVT Technologies (República Checa), así como los demás accesorios y conectores que permiten la transmisión de la señal eléctrica al computador. Las determinaciones realizadas se hicieron por cuadruplicado. Se siguieron las metodologías reportadas por Dan Siele, Lavagnini, Baldo, & Magno, 1998, Marioli & Kuwana, 1992, Novakowski et al., 2011 y (Yakovleva et al. 2007). En la Figura 2-13 se puede observar el sistema empleado.



Figura 2-13 Imagen del sistema empleado para realización de mediciones electroquímicas

▪ Pruebas iniciales en el sistema electroquímico

De acuerdo con las recomendaciones del fabricante del potencióstato, se llevó a cabo inicialmente una prueba de funcionamiento de cada uno de los cuatro canales empleando para ello el kit que con esta función viene con el equipo; esta prueba permitió la verificación de la comunicación entre el computador y el potencióstato.

Las condiciones a las que se realizaron estas pruebas se presentan en la tabla 2-3.

Tabla 2-3 Condiciones prueba de pulso diferencial e identificación de ruido en el sistema

Ensayo	Pulso diferencial	Ruido
Técnica utilizada	Pulso Diferencial	Barrido lineal
Voltaje Inicial	-0.5 V	-0.5 V
Voltaje Final	0.5 V	0.5 V
Paso	0.005 V	0.005 V
Voltaje de pulso	0.025	NA
Voltaje de acondicionamiento	-0.6 V	-1.2 V
Voltaje de profundidad	-0.5 V	-1 V
Velocidad de escansión	0.025 V/s	0.5 V
Tiempo del pulso	0.07 s	NA
Tiempo de equilibrio	8 s	8 s

▪ Selección y utilización de sensores

Para llevar a cabo la selección de los sensores, se utilizaron aquellos adquiridos a Palmsens, provenientes de BVT Technologies, República Checa. Inicialmente, se probó un kit llamado Starting Kit, el cual es un conjunto de diez sensores electroquímicos diferentes para encontrar la mejor opción para adaptarse a su aplicación; contiene 2 sensores de cada tipo.

En la tabla 2-4 se presentan las siglas empleadas por el fabricante y su respectivo significado. En la tabla 2-5 se presentan los sensores contenidos en el kit de inicio.

Tabla 2-4 Significado de las siglas empleadas por BVT para nombrar sus sensores.

Significado de las siglas	
A	Sensor amperométrico
C	Sensor conductimétrico
C	Base cerámica de corindón
1	Número de referencia del grupo de sensores
W	Material del electrodo de trabajo
	S Aleación de oro y platino
	1 Oro Puro
	2 Platino Puro
	3 Plata Pura
4 Grafito	
R	Material del electrodo de referencia
	S Plata
	1 Plata/Cloruro de Plata
	2 Plata recubierta con cloruro de plata

Tabla 2-5 Sensores contenidos en el kit de inicio (Starting Kit)

Posición		Tipo de sensor
1	2	AC1.W2.RS
3	4	AC1.W2.R1 (DW = 2 mm)
5	6	AC1.W4.R1 (DW = 2 mm)
7	8	AC1.W1.RS
9	10	AC2.WS.R1
11	12	CC1.W2
13	14	CC2.W2
15	16	AC1.W3.RS
17	18	AC1P.W1.R1
19	20	AC1.WS.R2

▪ **Ensayos con ferricianuro de potasio**

El ferricianuro de potasio, $K_3Fe(CN)_6$, es una sustancia referencia para llevar a cabo diferentes pruebas electroquímicas (Dayton et al. 1980); estos ensayos se llevaron a cabo con el fin de evaluar el comportamiento del sistema ante una sustancia estándar. A temperatura ambiente el ferrocianuro de potasio se presenta como un sólido de color amarillo claro e inodoro, y es un compuesto inocuo a condiciones normales. Es soluble en agua y su solución muestra fluorescencia verde-amarillo. Esta sal se utiliza muchas veces

en experimentos de fisiología como un medio para aumentar el potencial rédox de una solución. También se utiliza en muchos biosensores amperométricos como un agente de transferencia de electrones en sustitución del agente de transferencia de electrones natural de una enzima tal como el oxígeno para la enzima glucosa oxidasa.

Inicialmente se prepararon una solución de KCl 1M y otra de KNO₃ 0.1 M utilizando agua desionizada. Posteriormente, en cada una de ellas se preparó una solución de ferricianuro de potasio 20 mM.

La técnica utilizada fue voltametría cíclica, utilizando los sensores comerciales. Las condiciones de las pruebas se presentan en la tabla 2-6.

Tabla 2-6 Condiciones pruebas con ferricianuro de potasio

Técnica utilizada	Voltametría Cíclica
Voltaje 1	-1 V
Voltaje 2	1 V
Paso	0.05 V
Voltaje Inicial	1 V
Voltaje de acondicionamiento	0 V
Voltaje de profundidad	0 V
Velocidad de escansión	0.1 V/s
Número de escansiones	4

Se hicieron ensayos preliminares con todos los sensores; se utilizó la técnica de voltametría cíclica, y se determinó la señal obtenida para soluciones de ferricianuro de potasio con concentraciones de 1, 3, 5, 7 y 9 mM, con el fin de establecer el comportamiento del sistema con una sustancia referencia.

▪ **Ensayos con soluciones modelo**

Con el fin de evaluar el comportamiento de diferentes sensores comerciales, y seleccionar los adecuados para llevar a cabo la evaluación de muestras de hidromiel, se prepararon soluciones de 16 sustancias diferentes, que pueden estar presentes en las muestras iniciales, intermedias y finales, de acuerdo con el comportamiento de la levadura a lo largo de la fermentación (Ugliano & Henschke 2009), las cuales se presentan en la tabla 2-7.

Tabla 2-7 Soluciones de sustancias puras utilizadas para ser evaluadas con el sistema electroquímico

Sustancia	Concentración (%P/V)
Agua	100
Etanol	9,468
Glicerol	1,400
Ácido acético	0,150
Acetaldehído	0,010
Metanol	0,030
Acetato de etilo	0,010
Propanol	0,015
Alcohol Isoamílico	0,020
Isopropanol	0,015
Ácido tarárico	0,420
Ácido succínico	0,056
Ácido cítrico	0,025
Ácido láctico	0,113
Sacarosa	0,002
Fructosa	0,105
Glucosa	0,086

Se llevó a cabo una evaluación electroquímica utilizando los sensores AC1W4R1 (grafito), AC1W2R1 (platino) y AC1W1RS (oro). Se utilizó solución de cloruro de potasio 0.1 M y adición de 600 μ L de las soluciones de las sustancias preparadas. La técnica utilizada en todos los casos fue voltametría cíclica y las condiciones evaluadas se presentan en la tabla 2-8.

Tabla 2-8 Condiciones utilizadas para evaluar diferentes soluciones de sustancias presentes en la fermentación alcohólica

Técnica utilizada	Voltametría Cíclica
Voltaje 1	1 V
Voltaje 2	-1 V
Paso	0.005 V
Voltaje Inicial	1 V
Voltaje de acondicionamiento	0 V
Voltaje de profundidad	0 V
Velocidad de escansión	0.05 V/s
Número de escansiones	4

▪ Ensayos preliminares con muestras reales

Se realizó un ensayo en el que se evaluaron muestras reales (hidromieles) y otro tipo de soluciones con los mismos sensores seleccionados. Se utilizó una solución KCl 0.2 M. En todos los casos se utilizaron 10 mL de solución de KCl y se adicionó 1 mL de cada una de las cuatro muestras evaluadas. Se utilizaron los sensores anteriormente evaluados: AC1W4R1 (grafito), C1W2R1 (platino) y AC1W1RS (oro). La técnica utilizada fue voltametría cíclica. Las condiciones de las pruebas se presentan en la tabla 2-9.

Tabla 2-9 Condiciones pruebas con diferentes muestras y KCl 0.2 M

Técnica utilizada	Voltametría Cíclica
Voltaje 1	1 V
Voltaje 2	-1 V
Paso	0.005 V
Voltaje Inicial	1 V
Voltaje de acondicionamiento	0 V
Voltaje de profundidad	0 V
Velocidad de escansión	0.05 V/s
Número de escansiones	4

Las muestras evaluadas fueron: una solución que contenía etanol al 12% v/v y ácido tartárico 0.033 M, pH 3.6 recomendada por (Kilmartin & Zou 2001); un hidromiel comercial, proveniente de la región del Huila, y dos hidromieles elaborados en el ICTA con la metodología de (Blanco 2012), los cuales contenían sulfato de amonio, y polen como fuentes de nitrógeno.

▪ Caracterización de algunas bebidas alcohólicas utilizando voltametría cíclica y sensores comerciales

Se llevó a cabo la caracterización de algunas bebidas alcohólicas utilizando voltametría cíclica y sensores comerciales. Se evaluaron diferentes muestras empleando los tres sensores evaluados anteriormente: AC1W4R1 (grafito), C1W2R1 (platino) y AC1W1RS (oro). Las muestras evaluadas fueron una solución de etanol al 12% v/v y de ácido tartárico 0.033 M, pH 3,6, mosto de miel (pH 3.79, 17 °Brix), hidromiel (pH 3.96, 5 °Brix), hidromiel con polen (pH 3.88, 4.8 °Brix), hidromiel comercial (pH 3.60, 21 °Brix), hidromiel de maracuyá (pH 3.68, 9.6 °Brix), y vino de maracuyá (pH 3.48, 7 °Brix). Las condiciones del análisis se presentan en la tabla 2-10.

Tabla 2-10 Condiciones de las pruebas con diferentes muestras

Técnica utilizada	Voltametría Cíclica
Voltaje 1	1 V
Voltaje 2	-1 V
Paso	0.005 V
Voltaje Inicial	1 V
Voltaje de acondicionamiento	0 V
Voltaje de profundidad	0 V
Velocidad de escansión	0.05 V/s
Número de escansiones	15

▪ **Evaluación de algunos ácidos orgánicos**

De acuerdo con los resultados satisfactorios del sensor AC1W2R1 (platino), se llevó a cabo la evaluación de soluciones de algunos ácidos orgánicos, de acuerdo con la metodología reportada por (Daniele et al. 1998). Para ello se utilizó una solución de ácido perclórico 1 mM con cloruro de potasio 0.1 M. Se evaluaron ácido tartárico, ácido málico, ácido cítrico y ácido acético, debido a su posible presencia en la fermentación alcohólica. Las concentraciones evaluadas fueron 3, 5, 8 y 10 mM en todos los casos. Se utilizó voltametría de onda cuadrada. Las condiciones analíticas utilizadas para estas evaluaciones se presentan en la tabla 2-11.

Tabla 2-11 Condiciones de las pruebas con sensores de platino y solución de ácido perclórico + cloruro de potasio

Técnica utilizada	Voltametría de onda cuadrada
Voltaje inicial	-1 V
Voltaje Final	0 V
Paso	0.005 V
Amplitud	0.025 V
Voltaje de acondicionamiento	0 V
Voltaje de profundidad	0 V
Frecuencia	25 Hz
Número de escansiones	3

Como se mencionó en el numeral 1.6.2, en cuanto a los sensores voltamétricos, existen diferentes modificaciones que se pueden realizar con el fin de obtener diferentes señales de corriente. Las modificaciones utilizadas en este trabajo emplearon cobre y nanotubos de carbono sobre los electrodos de grafito y carbón vítreo, con el fin de encontrar señales

relacionadas con el proceso de interés, tales como los carbohidratos y compuestos con características antioxidantes.

2.5.3 Modificación de sensores de grafito con cobre

Existen diversos métodos de cuantificación electroquímica de carbohidratos basados en la capacidad reductora de los azúcares, que tienen libre el grupo carbonilo. Estos carbohidratos son capaces de reducir elementos como el cobre, el hierro o el yodo (Cu^{+2} , Fe^{+3} , I^0). En el caso específico del cobre, éste es reducido de Cu^{+2} a Cu^{+1} en el método para carbohidratos totales de Munson-Walker, reportado por la AOAC 906.03-1906 (AOAC, 2005). Allí se hace reaccionar el sulfato de cobre (II) con un azúcar reductor en medio alcalino formándose el óxido cuproso, el cual forma un precipitado rojo ladrillo. Este método utiliza azul de metileno como indicador, el cual es totalmente decolorado en el punto final de esta reacción. Sin embargo, este método es dispendioso por el tratamiento que la muestra debe sufrir, así como con la preparación de los reactivos necesarios para las determinaciones.

Tanto para los ensayos en Colombia como en Italia se utilizaron diferentes sensores que tenían como electrodo de trabajo el de grafito. En Colombia, se emplearon los sensores AC1W4R1; en Italia se empleó el electrodo de carbón vítreo. Dichos electrodos de trabajo fueron modificados utilizando la electrodeposición de cobre (II) queriendo emplear los principios de la técnica mencionada al principio de este apartado. Para ello se preparó una solución de sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 200 mM. Las condiciones a las cuales se llevó a cabo esta electrodeposición se presentan en la tabla 2-12.

Tabla 2-12 Condiciones de electrodeposición de cobre sobre sensores AC1W4R1 y electrodo de carbón vítreo

Técnica utilizada	Detección amperométrica
Voltaje	-0.6 V
Intervalo	0.1 s
Tiempo de corrida	1200 s

Posteriormente, se siguieron las indicaciones reportadas por Marioli & Kuwana, 1992 para llevar a cabo las determinaciones con diferentes soluciones de carbohidratos y alcoholes en medio alcalino. Para todos los casos se utilizó una solución de NaOH 0.1 M.

▪ **Ensayos preliminares para electrodo de grafito modificado con cobre**

Se utilizó el electrodo de grafito vítreo modificado de acuerdo con el procedimiento mencionado anteriormente y las condiciones que se especifican en la tabla 2-13. Se realizaron ensayos utilizando voltametría cíclica con las condiciones que se presentan en la tabla 2-14. Posteriormente, se llevaron a cabo pruebas similares utilizando voltametría de onda cuadrada, con las condiciones que se presentan en la tabla 2-15. Se evaluaron en todos los casos glucosa, fructosa, sacarosa y etanol. Estas pruebas se realizaron con el fin de establecer la presencia de estas sustancias y diferenciar las señales.

Tabla 2-13 Condiciones pruebas con soluciones de alcoholes y carbohidratos en medio alcalino y con electrodo de carbón vítreo modificado con cobre, usando voltametría cíclica.

Técnica utilizada	Voltametría Cíclica
Voltaje 1	-0.2 V
Voltaje 2	1 V
Paso	0.005 V
Voltaje Inicial	0 V
Voltaje de acondicionamiento	0 V
Voltaje de profundidad	0 V
Velocidad de escansión	0.05 V/s
Número de escansiones	2

Tabla 2-14 Condiciones pruebas con soluciones de alcoholes y carbohidratos en medio alcalino y con electrodo de carbón vítreo modificado con cobre, utilizando voltametría de onda cuadrada.

Técnica utilizada	Voltametría de onda cuadrada
Voltaje inicial	-0.2 V
Voltaje final	1.0 V
Amplitud	0.025 V
Frecuencia	25 Hz
Tiempo de acondicionamiento	0.04 s

Posteriormente, se llevaron a cabo ensayos con voltametría cíclica utilizando el electrodo AC1W4R1, y modificándolo de acuerdo con las condiciones presentadas en la tabla 2-13. Se evaluaron las señales obtenidas con glucosa, fructosa, sacarosa, metanol, etanol, metanol, isopropanol, propanol y alcohol isoamílico. En la tabla 2-15 se presentan las condiciones utilizadas para llevar a cabo estas determinaciones.

Tabla 2-15 Condiciones pruebas con alcoholes y carbohidratos en medio alcalino y con electrodo AC1W4R1 modificado con cobre, utilizando voltametría cíclica.

Técnica utilizada	Voltametría Cíclica
Voltaje 1	1 V
Voltaje 2	-1 V
Paso	0.005 V
Voltaje Inicial	1 V
Voltaje de acondicionamiento	0 V
Voltaje de profundidad	0 V
Velocidad de escansión	0.05 V/s
Número de escansiones	4

▪ **Validación de las mediciones obtenidas con el electrodo de grafito modificado con cobre**

De acuerdo con las diferentes sustancias importantes para la fermentación alcohólica, se generaron diferentes curvas de calibración para soluciones de glucosa, fructosa, sacarosa, etanol y glicerol, utilizando el electrodo AC1W4R1, modificado de acuerdo con las condiciones expresadas en la tabla 2-13.

Para llevar a cabo estas determinaciones, se utilizaron 7 mL de hidróxido de sodio 0.1 M como solución búfer y se adicionaron diferentes volúmenes de soluciones madre de las sustancias anteriormente mencionadas desde 10 hasta 100 μ L. Las soluciones madre de los carbohidratos fueron de 25%, la de glicerol 10% y la de etanol de 20%; estas concentraciones se seleccionaron teniendo en cuenta las concentraciones máximas posibles a obtener en el proceso fermentativo que se llevó a cabo (Ugliano & Henschke 2009). Cada una de las mediciones se hizo por cuadruplicado.

2.5.4 Modificación de sensores de grafito con nanotubos de carbono

De acuerdo con lo reportado por Wang 2005, los nanotubos de carbono (CNT) se han convertido en objeto de una intensa investigación desde su descubrimiento, debido a sus notables propiedades químicas, eléctricas, mecánicas y estructurales. Pueden llevar a cabo el transporte de electrones como los metales, semiconductores y superconductores, ya que poseen un núcleo hueco adecuado para almacenar moléculas y tienen el mayor módulo elástico de cualquier material conocido. Este tipo de nanotubos se pueden producir por

deposición química de vapor, métodos de arco de carbono, o evaporación por láser y se puede dividir en nanotubos de carbono de pared sencilla (SWCNT) y de pared múltiple (MWCNT). Los de pared sencilla poseen una nanoestructura cilíndrica (con una alta relación de aspecto), los cuales se forman enrollando una sola hoja en un tubo de grafito. En el caso de aquellos de pared múltiple, comprenden varias capas de cilindros de grafema que están concéntricamente anidados como los anillos de un tronco de árbol. Las propiedades únicas de los nanotubos de carbono los hacen extremadamente atractivos como sensores químicos, en la detección en general, y electroquímica, en particular (Balasubramanian & Burghard 2006; Li et al. 2011).

Wang también menciona que además de una mayor reactividad electroquímica debido a su baja resistividad; los electrodos modificados con nanotubos de carbono se han mostrado útiles para acumular biomoléculas importantes (por ejemplo, ácidos nucleicos) y para aliviar los efectos de ensuciamiento de superficie. La notable sensibilidad de los nanotubos a la conductividad de los adsorbatos de superficie permite su uso como sensores a nanoescala altamente sensibles. Para ello, los nanotubos de carbono deben ser funcionalizados adecuadamente para que puedan ser aprovechadas todas sus ventajas (Li et al. 2011).

▪ **Ensayos iniciales**

Los nanotubos de carbono utilizados en este trabajo fueron adquiridos a Nanolab, Inc (Estados Unidos). Eran nanotubos BPD30L15, de pared múltiple de 30 nm +/-15nm, de 1-5 μm , con pureza mayor al 95% y superficie activa entre 200 y 400 m^2/g . Dichos nanotubos se activaron de acuerdo con la metodología reportada por (Li et al. 2011) antes de su uso; posteriormente, se tomaron 10 mg de nanotubos activos y se suspendieron en 5 mL de etanol al 95%; posteriormente se tomaron 4 μL de esta suspensión y se aplicaron sobre un sensor de grafito AC1W4R1, dejando evaporar el solvente durante 5 minutos. Posteriormente, se llevaron a cabo las mediciones. Este mismo procedimiento se usó para modificar el electrodo de carbón vítreo. La metodología utilizada fue la reportada por (Yakovleva et al. 2007), para lo cual se utilizó una solución búfer de fosfato de potasio 0.2 M, pH 6.0 más cloruro de potasio 0.1 M, y voltametría de onda cuadrada.

El ácido cafeico es un compuesto orgánico que es considerado como compuesto referencia en la determinación de compuestos antioxidantes (Photinon et al. 2010), por ello se empleó como patrón antioxidante en este trabajo.

Se llevaron a cabo mediciones con una solución de ácido caféico 10 mM preparada en etanol, la cual se adicionó a la solución búfer de fosfato de potasio. En todos los casos se tomaron 7 mL del búfer y se adicionaron diferentes cantidades de la solución madre de ácido caféico desde 10 hasta 50 μ L. Las condiciones a las cuales se llevaron a cabo estos ensayos, se presentan en la tabla 2-16.

Tabla 2-16 Condiciones para ensayos con ácido cafeico 10 mM, búfer de fosfato de potasio, pH 6 + KCl 0.1 M y electrodo de grafito modificado con nanotubos de carbono.

Técnica utilizada	Voltametría Cíclica
Voltaje 1	0 V
Voltaje 2	0.6 V
Paso	0.05 V
Voltaje Inicial	1 V
Voltaje de acondicionamiento	0 V
Voltaje de profundidad	0 V
Velocidad de escansión	0.1 V/s
Número de escansiones	4

Estas pruebas también se llevaron a cabo en el sistema electroquímico marca Metrohm, utilizando el electrodo de carbón vítreo ubicado en Bolzano, Italia. Las condiciones utilizadas para este ensayo se presentan en la tabla 2-17.

Tabla 2-17 Condiciones para ensayos con ácido cafeico 10 mM, búfer de fosfato de potasio, pH 6 + KCl 0.1 M y electrodo de carbón vítreo modificado con nanotubos de carbono.

Técnica utilizada	Voltametría Cíclica
Voltaje 1	0 V
Voltaje 2	0.4 V
Paso	0.005 V
Voltaje Inicial	0 V
Voltaje de acondicionamiento	0 V
Voltaje de profundidad	0 V
Velocidad de escansión	0.05 V/s
Número de escansiones	2

- **Curva de calibración para el ácido cafeico**

Se llevó a cabo la construcción de la curva de calibración para concentraciones de ácido cafeico entre 0 y 277,8 μM , utilizando la misma metodología de los ensayos iniciales. En este caso, las condiciones para la realización de la voltametría cíclica fueron similares a las utilizadas en la tabla 2-16, pero con una velocidad de escansión de 0.05 V/s; dichas condiciones se presentan en la tabla 2-18. Estas condiciones se emplearon para ambos tipos de sensores de grafito.

Tabla 2-18 Condiciones para ensayos con ácido cafeico 10 mM, búfer de fosfato de potasio, pH 6 + KCl 0.1 M y electrodo de grafito modificado con nanotubos de carbono.

Técnica utilizada	Voltametría Cíclica
Voltaje 1	0 V
Voltaje 2	0.6 V
Paso	0.005 V
Voltaje Inicial	1 V
Voltaje de acondicionamiento	0 V
Voltaje de profundidad	0 V
Velocidad de escansión	0.05 V/s
Número de escansiones	4

- **Validación de la curva de calibración para el ácido cafeico**

Se llevó a cabo la evaluación de la validación de la curva de calibración realizándose en tres momentos diferentes, entre concentraciones 0 y 168.5 μM . Se utilizó la misma metodología enunciada para la deposición de los nanotubos de carbono, y se empleó la técnica de voltametría de onda cuadrada, con el fin de observar la señal amplificada. En la tabla 2-19 se presenta la tabla correspondiente a las condiciones empleadas; estas condiciones se utilizaron para ambos electrodos de grafito.

Tabla 2-19 Condiciones para ensayos con ácido cafeico 10 mM, búfer de fosfato de potasio, pH 6 + KCl 0.1 M y electrodo de grafito modificado con nanotubos de carbono

Técnica utilizada	Voltametría de onda cuadrada
Voltaje inicial	0 V
Voltaje final	0.6 V
Amplitud	0.025 V
Frecuencia	25 Hz
Tiempo de acondicionamiento	0.04 s

- **Evaluación del comportamiento de la señal con la variación de pH para ácido cafeico**

Se evaluó el efecto del pH sobre la señal obtenida por la presencia de una sustancia en una solución, ya que (Wang 2000) afirma que este efecto existe. Para ello, se usó el sistema electroquímico marca Metrohm y el electrodo de carbón vítreo, ubicado en Bolzano, Italia. Se aplicó el mismo procedimiento mencionado en el numeral 2.5.3. Se utilizó voltametría cíclica, y se emplearon: soluciones de Britton-Robinson, pH 2 y 4, KCl 0.1 M, búfer de fosfato pH 7.4 y la solución de fosfatos 0.2 M pH 6.0 + KCl 0.1 M. Dichas soluciones Britton-Robinson son soluciones búfer de pH "universal" que se utilizan para el intervalo de pH 2 a pH 12. Se componen de una mezcla de ácido bórico 0,04 M, ácido fosfórico 0,04 M y ácido acético, la cual se valora con hidróxido de sodio 0.2 M hasta el pH deseado. En todos los casos se utilizó una solución madre de ácido cafeico 10 mM preparada en etanol al 95%; la concentración final de la solución evaluada fue de 56.8 μ M de ácido para todos los casos. En la tabla 2-20 se presentan las condiciones a las cuales se llevaron a cabo los ensayos.

Tabla 2-20 Condiciones para ensayos con ácido cafeico 56.8 μ M, electrodo de carbón vítreo modificado con nanotubos de carbono y diferentes soluciones

Técnica utilizada	Voltametría Cíclica
Voltaje 1	0 V
Voltaje 2	1 V
Paso	0.005 V
Voltaje Inicial	0 V
Voltaje de acondicionamiento	0 V
Voltaje de profundidad	0 V
Velocidad de escansión	0.05 V/s
Número de escansiones	2

- **Evaluación de muestras reales**

Teniendo en cuenta el comportamiento del ácido cafeico y las condiciones de la tabla 2-19, se llevó a cabo la evaluación de las diferentes señales obtenidas para diferentes muestras reales relacionadas con aquellas obtenidas mediante los procesos de fermentación realizados. Se utilizó el sistema marca Metrohm y el electrodo de carbón vítreo modificado de acuerdo con las condiciones mencionadas en el numeral 2.5.3. Las condiciones utilizadas para llevar a cabo estas determinaciones son las mismas presentadas en la tabla 2-20. Para todos los casos se utilizaron 7 mL de búfer de fosfato 0.2M, pH 6.0 y cloruro de potasio 0.1M, y 400 μ L de muestra.

2.5.5 Determinaciones con nariz electrónica y lengua electrónica comerciales

▪ Nariz electrónica

Los análisis se realizaron con una nariz electrónica portátil (PEN2) que funciona con una zona de enriquecimiento y una unidad de desorción (EDU). El programa utilizado para adquisición de datos era de WMA (Win Muster AIRSENSE) Analytics Inc. (Alemania). Este instrumento se encuentra en los laboratorios del Departamento de Ciencia para los Alimentos, la Nutrición y el Ambiente (Defens) de la Universidad de Milán (Italia). El instrumento, consta de un aparato de toma de muestras, una unidad de detección que contiene la matriz de sensores, y un software de reconocimiento de patrones (WinMuster v.3.0). El conjunto de sensores se compone de 10 sensores químicos semiconductores de óxido metálico (MOS): W1C (aromático), W5S (amplia gama), W3C (aromático), W6S (hidrógeno), W5C (fracción aromática con alifáticos), W1S (amplia gama-metano), W1W (azufre orgánico), W2S (amplia gama alcohol), W2W (azufre y cloro) W3S (metano alifático).

En la figura 2-14 se puede observar un esquema del instrumento empleado:

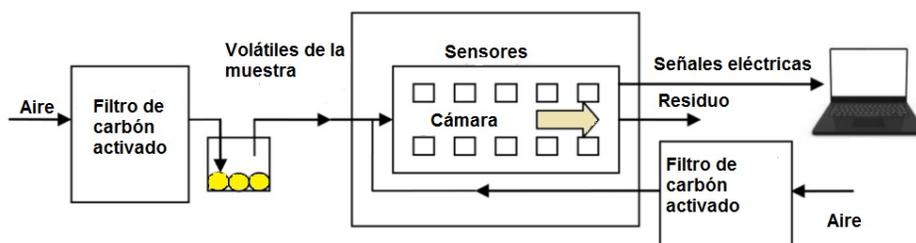


Figura 2-14 Esquema de nariz electrónica (Tomado y adaptado de (Xu et al. 2014))

▪ Lengua electrónica comercial

Con el fin de comparar los resultados obtenidos con el sistema de gusto artificial y de alguna forma validar estos resultados se empleó una lengua electrónica comercial.

Los análisis se realizaron con el equipo disponible comercialmente Taste-Sensing System SA 402B de Intelligent Sensor Technology Co., ubicado en los laboratorios del Departamento de Ciencia para los Alimentos, la Nutrición y el Ambiente (Defens) de la

Universidad de Milán (Italia); el sistema consiste en sensores de detección cuya superficie se combina con membranas lipídicas artificiales que tienen diferentes propiedades de respuesta a sustancias químicas sobre la base de su gusto. La tabla 2-21 recoge los sensores de detección utilizados en este trabajo.

Tabla 2-21 Características de los sensores de detección utilizados

Atributo	Sensores de detección	Características (Información sensorial)	Ecuación empleada
Membrana mezclada	CT0 CA0	Salado Ácido	Ácido = $0.3316 \cdot R_v$ (CA0) Salado = $-0.252 \cdot R_v$ (CT0)
Membrana de carga positiva	C00 AE1	Amargo y retrogusto de amargo Astringencia y retrogusto de astringencia	Amargo = $-0.140 \cdot R_v$ (C00) + $0.084 \cdot R_v$ (CT0) Retrogusto de amargo = $-0.210 \cdot \text{CPAV}$ (C00) Astringencia = $-0.1575 \cdot R_v$ (AE1) + $0.1575 \cdot R_v$ (CT0) Retrogusto de astringencia = $-0.252 \cdot \text{CPAV}$ (AE1)
Membrana con anillo de benceno y tres grupos carboxilo	GL1	Dulce	Dulce = $-0.2351 \cdot R_v$ (GL1)

El principio de medición de la lengua electrónica comercial se basa en la capacidad de las sustancias que aportan sabor para cambiar el potencial de los sensores de detección a través de la interacción electrostática o hidrófoba con los grupos hidrófilos e hidrófobos de las membranas lipídicas. Los sensores de detección se sumergieron primero en la solución de referencia (cloruro de potasio 30 mM y ácido tartárico 0.3 mM) y el potencial eléctrico medido para cada sensor se definió como V_r . Posteriormente, los sensores se sumergieron durante 30 s en una muestra de 60 mL de mosto de hidromiel, equilibrado a temperatura ambiente. Para cada sensor se define el potencial medido como V_s . El valor relativo (R_v) estuvo representado por las diferencias ($V_s - V_r$) entre los potenciales de la muestra y la solución de referencia. Luego los sensores se enjuagaron con solución de referencia fresca durante 6 s, y luego se sumergieron en la solución de referencia de nuevo. El nuevo potencial para la solución de referencia se definió como V_r' . La diferencia $V_r' - V_r$ entre los potenciales de la solución de referencia antes y después de la medición de la muestra es el

CPA_v (Cambio de potencial de membrana causada por absorción) y corresponde al retrogusto. Antes de un nuevo ciclo de medición, los electrodos se enjuagaron durante 90 s con una solución de lavado (etanol al 30%) y luego durante 180 s con la solución de referencia.

A lo largo de la fermentación de un hidromiel tradicional, cada muestra se evaluó dos veces y los promedios de las salidas de los sensores se convirtieron a información sensorial. Los "valores" sensoriales se calcularon multiplicando las salidas de los sensores para los coeficientes apropiados basados en la ley empírica de Weber-Fechner, que da la intensidad de la sensación teniendo en cuenta las propiedades de los sensores para los gustos (Buratti et al. 2011), como se muestra en la última columna de la Tabla 2-21.

En la figura 2-15 se puede observar la figura del instrumento empleado para estas determinaciones.

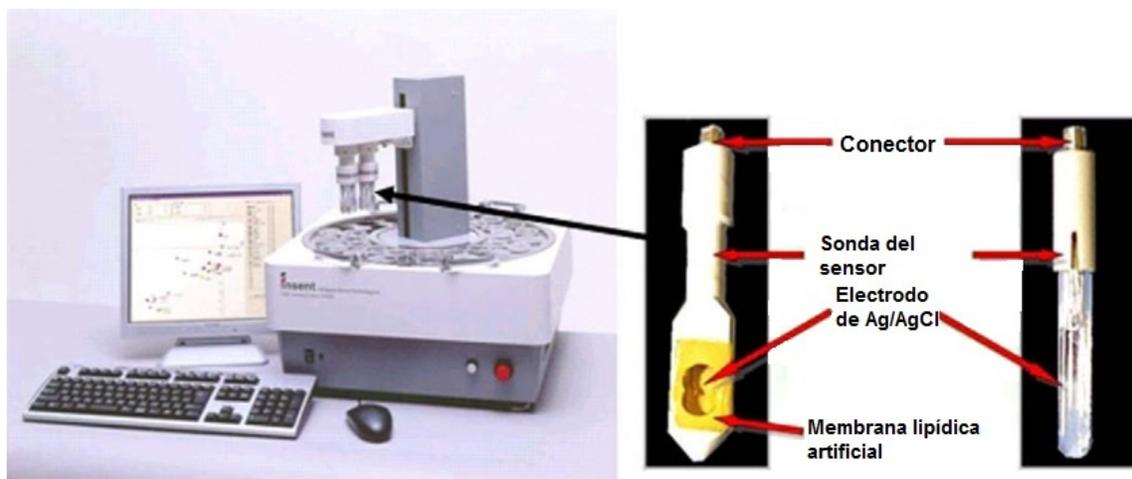


Figura 2-15 Imágenes del Taste Sensing System SA 402 B (Tomado y adaptado de (Laureati et al. 2010))

Los resultados obtenidos, así como su análisis en el desarrollo de este trabajo se presentarán en los tres capítulos siguientes.

En las tablas 2-22 y 2-23 se presenta un resumen de los ensayos realizados en la parte de selección de sensores y monitoreo de fermentaciones, respectivamente.

Tabla 2-22 Ensayos realizados para la selección de sensores

Muestra	Solución búfer	Sensores
Ferricianuro de potasio	KNO ₃ , KCl	<ul style="list-style-type: none"> • AC1W4R1 grafito • AC1W2R1 platino • AC1W1RS oro
Soluciones sustancias puras	KCl	<ul style="list-style-type: none"> • AC1W4R1 grafito • AC1W2R1 platino • AC1W1RS oro
Muestras hidromieles	KCl	<ul style="list-style-type: none"> • AC1W4R1 grafito • AC1W2R1 platino • AC1W1RS oro
Muestras hidromieles	Sin búfer	<ul style="list-style-type: none"> • AC1W4R1 grafito • AC1W2R1 platino • AC1W1RS oro
Ácidos orgánicos	HClO ₄ + KCl	<ul style="list-style-type: none"> • AC1W2R1 platino
Azúcares	NaOH	<ul style="list-style-type: none"> • Carbón vítreo+CuSO₄ • AC1W4R1 grafito+ CuSO₄
Ácido cafeico	KH ₂ PO ₄ + KCl, pH 6.0	<ul style="list-style-type: none"> • AC1W4R1 +nanotubos de carbono • Carbón vítreo+ nanotubos de carbono

Tabla 2-23 Fermentaciones realizadas para monitoreo con diferentes técnicas de análisis

Fermentación	Técnicas empleadas
Miel, azúcar, miel comercial	<ul style="list-style-type: none"> • AC1W2R1 platino • AC1W4R1 grafito+ CuSO₄
Miel, 10,20,30% azúcar	<ul style="list-style-type: none"> • Carbón vítreo+CuSO₄ • FTIR-ATR
Adición de ají y clavo	<ul style="list-style-type: none"> • AC1W2R1 platino • AC1W4R1 grafito+ CuSO₄ • FTIR-ATR • PTR-MS
Adición de hierbas y especias	<ul style="list-style-type: none"> • AC1W2R1 platino • AC1W4R1 grafito+ CuSO₄
Adición de frutos rojos, fuentes de Nitrógeno, tratamientos de higienización	<ul style="list-style-type: none"> • AC1W2R1 platino • AC1W4R1 grafito+ CuSO₄
Hidromiel tradicional	<ul style="list-style-type: none"> • AC1W2R1 platino • AC1W4R1 grafito+ CuSO₄ • Nariz y lengua electrónica comerciales • Análisis sensorial

3. Selección de sensores

Como se mencionó anteriormente, el sistema de gusto artificial seleccionado y adquirido consta de un potenciómetro marca Palmsens, proveniente de Holanda y sensores de BVT Technologies, provenientes de República Checa. Su selección se describe en el Anexo F. Con dichos insumos se llevó a cabo la selección de los sensores que más se adecuaron para la aplicación de este trabajo.

3.1 Pruebas iniciales en el sistema electroquímico

De acuerdo con la metodología descrita en el numeral 2.5.2 referente a las pruebas iniciales en el sistema electroquímico, se obtuvieron los resultados para cada uno de los canales evaluados que se presentan en las figuras 3-1 y 3-2. En la tabla 3-1 se presentan los resultados estadísticos para ambas pruebas, realizando un análisis ANOVA Kruskal Wallis con 95% de confiabilidad, allí se puede evidenciar que no hay diferencias significativas entre las respuestas obtenidas a través de cada uno de los canales utilizados, y que las mediciones realizadas provienen de poblaciones que son similares. Adicionalmente, el tiempo de las respuestas coincide con aquellas reportadas por el fabricante, haciendo que las condiciones del sistema sean adecuadas para llevar a cabo la aplicación en diferentes matrices.

Tabla 3-1. Resultados Prueba Kruskal Wallis con 95% de confiabilidad para el sistema.

Prueba	Chi-Cuadrado	GL	Prob>Chi-Cuadrado
Barrido lineal	0,67353	3	0,87941
Ruido	0,52706	3	0,91291

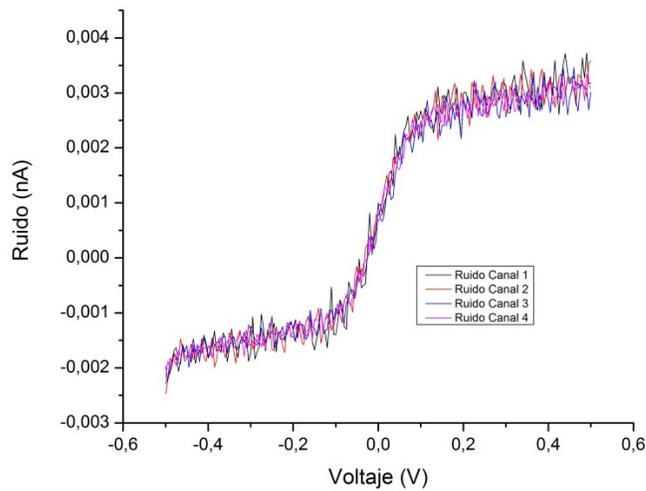


Figura 3-1. Resultados de prueba barrido lineal para todos los canales con el kit para test de funcionamiento

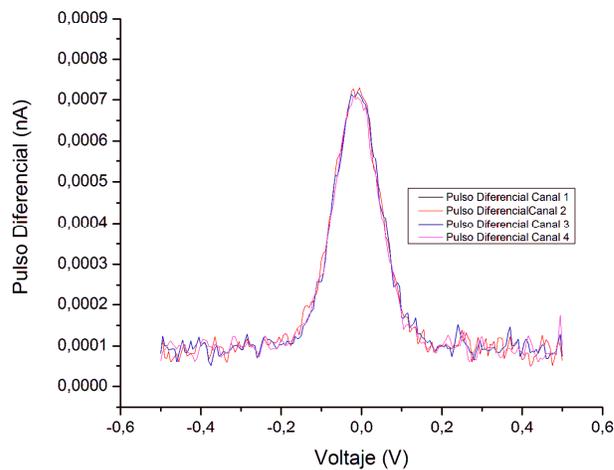


Figura 3-2. Resultados de prueba de ruido para todos los canales con el kit para test de funcionamiento

Los resultados evidenciados permiten establecer que el potencióstato, los conectores y sensores adquiridos permiten obtener señales similares a las que el fabricante reporta, permitiendo la realización de diferentes pruebas utilizando diferentes soluciones búfer, muestras y técnicas.

3.2 Ensayos con ferricianuro de potasio y diferentes soluciones búfer

Para poder llevar a cabo la selección de los diferentes sensores comerciales disponibles, de acuerdo con la metodología descrita en el numeral 2.5.2, y las condiciones de la tabla 2-6, se realizaron ensayos utilizando ferricianuro de potasio como sustancia referencia, así como soluciones búfer de nitrato de potasio y cloruro de potasio, con el fin de establecer cómo es el funcionamiento del sistema electroquímico.

3.2.1 Ensayos con nitrato de potasio

Se implementó la metodología referida en el numeral 2.5.1; se utilizó una solución de nitrato de potasio y cuatro tipos de sensores: AC1W4R1 (grafito), con diámetro 1 mm y 2 mm, AC1W2R1 (platino) y AC1W1RS (oro).

En la figura 3-3 se presentan los resultados obtenidos para el sensor de grafito de diámetro de 1 mm, a pesar que se incrementó la concentración de la solución de ferricianuro de potasio, la señal obtenida fue similar para todas las concentraciones. En la figura 3-4 se presenta un comportamiento contrario, para la señal del electrodo de grafito de diámetro 2 mm donde hay un incremento en el pico de oxidación a medida que se incrementa la concentración de la solución de ferricianuro de potasio, evidenciando la importancia del área de reacción.

En las figuras 3-5 y 3-6 se presentan los resultados obtenidos para los electrodos de platino y oro; todas las figuras permiten observar diferencias entre las señales obtenidas para cada electrodo y su variación con el incremento de la concentración de la solución de ferricianuro. Estos resultados muestran que se puede obtener información de la variación de la señal más clara para los sensores de oro y platino.

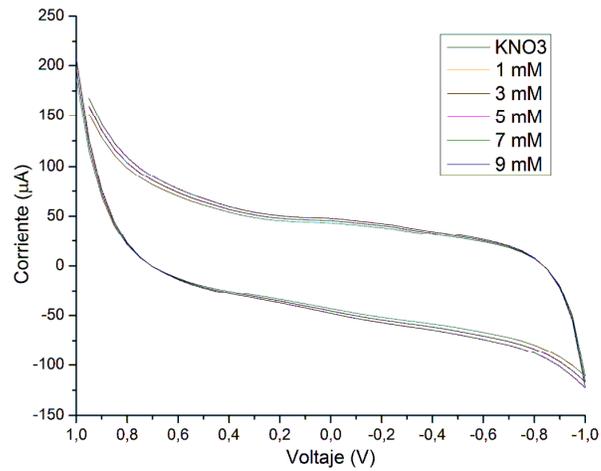


Figura 3-3. Voltametría cíclica de una solución de ferricianuro de potasio con el sensor AC1W4R1 Dw=1 mm (grafito) y nitrato de potasio 0.1 M como búfer

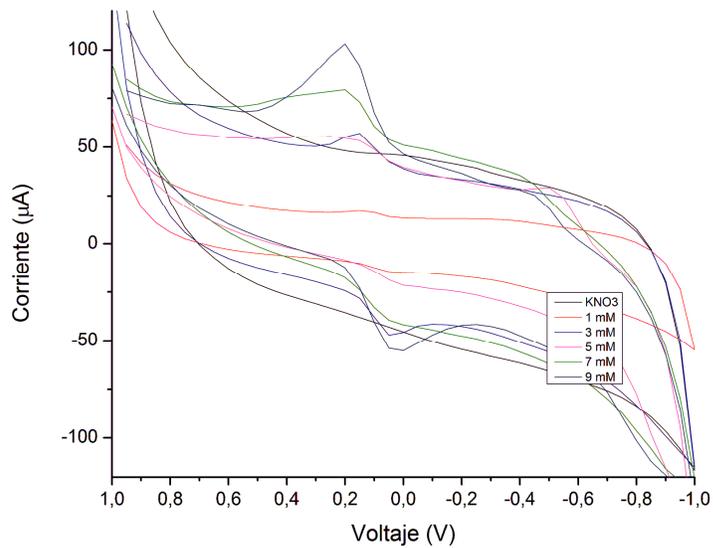


Figura 3-4. Voltametría cíclica de una solución de ferricianuro de potasio con el sensor AC1W4R1 Dw=2 mm (grafito) y nitrato de potasio 0.1 M como búfer

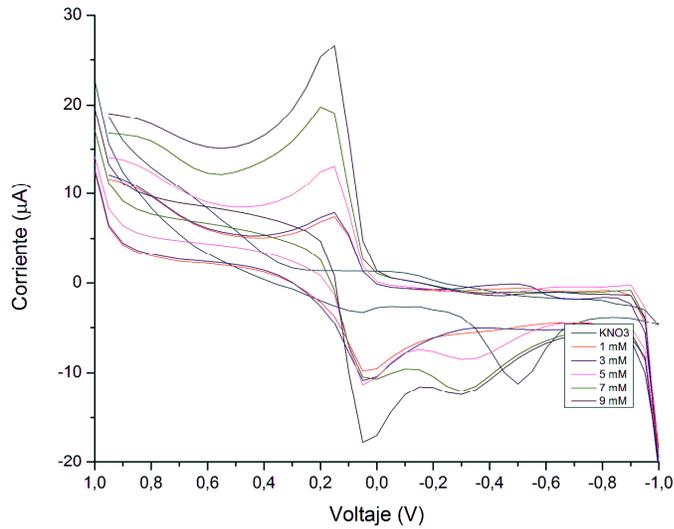


Figura 3-5. Voltametría cíclica de una solución de ferricianuro de potasio con el sensor AC1W2R1 (platino) y nitrato de potasio 0.1 M como búfer

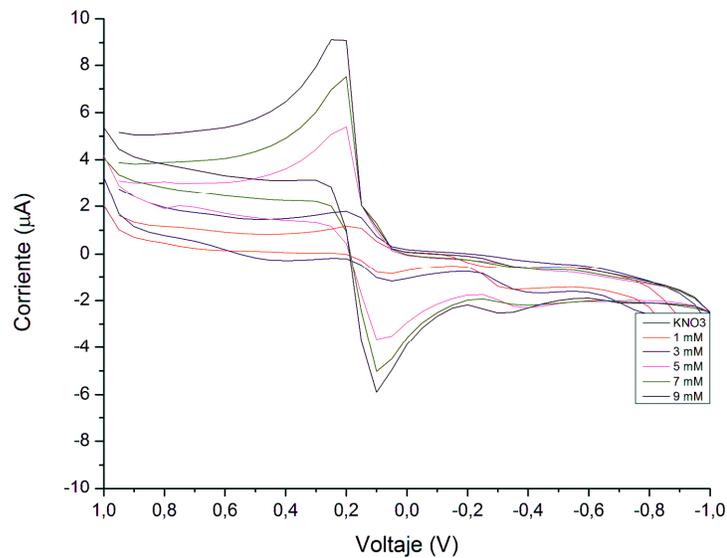


Figura 3-6. Voltametría cíclica de una solución de ferricianuro de potasio con el sensor AC1W1RS (oro) y nitrato de potasio 0.1 M como búfer

Estos resultados permitieron seleccionar solo tres de los cuatro sensores evaluados, debido a que el electrodo de diámetro menor de grafito (diámetro 1 mm) no aporta información útil.

3.2.2 Ensayos con cloruro de potasio como búfer

Posteriormente, se llevaron a cabo ensayos similares a los realizados con nitrato de potasio, pero utilizando cloruro de potasio. Se evaluó el comportamiento de los sensores AC1W4R1 (grafito) diámetro 2 mm, AC1W2R1 (platino) y AC1W1RS (oro). En las figuras 3-7 a 3-9 se presentan los resultados obtenidos para cada uno de los sensores evaluados. Se observa que a medida que se incrementó la concentración del ferricianuro de potasio, la curva cambió, y el pico máximo de oxidación aumentó debido a la mayor concentración de la solución. Estos resultados son acordes a lo observado en diversos reportes. (Pumera et al. 2006).

Estos resultados permitieron establecer la capacidad de realizar diferentes ensayos teniendo en cuenta las recomendaciones del fabricante, los resultados observados por otros autores con dispositivos diferentes y las respuestas esperadas, gracias a que el ferricianuro de potasio se comporta como una sustancia que se reduce y oxida de forma parcialmente reversible.

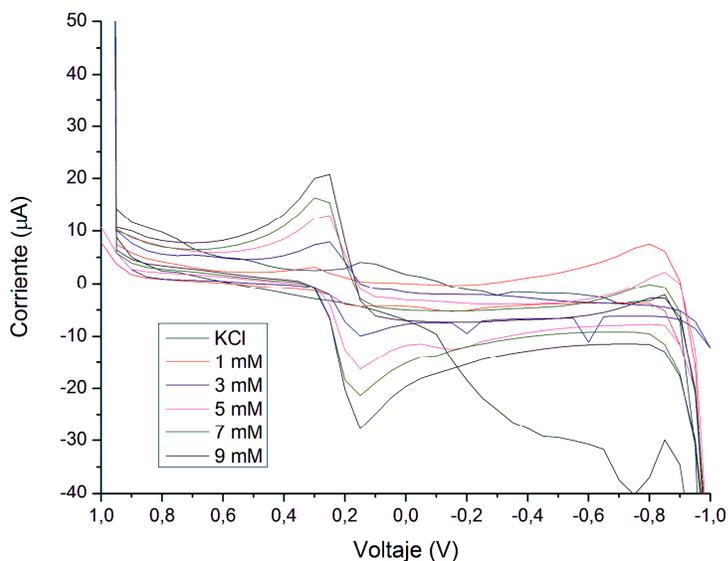


Figura 3-7. Voltametría cíclica de una solución de ferricianuro de potasio con el sensor el sensor AC1W4R1 DW = 2 mm (grafito) y cloruro de potasio 1 M como búfer

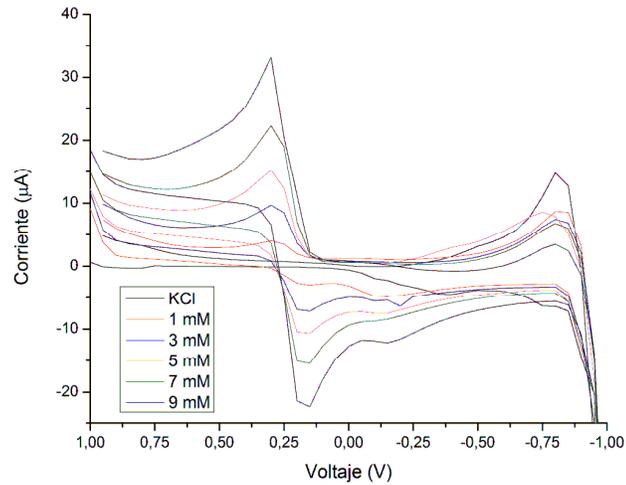


Figura 3-8. Voltametría cíclica de una solución de ferricianuro de potasio con el sensor AC1W2R1 (platino) cloruro de potasio 1 M como búfer

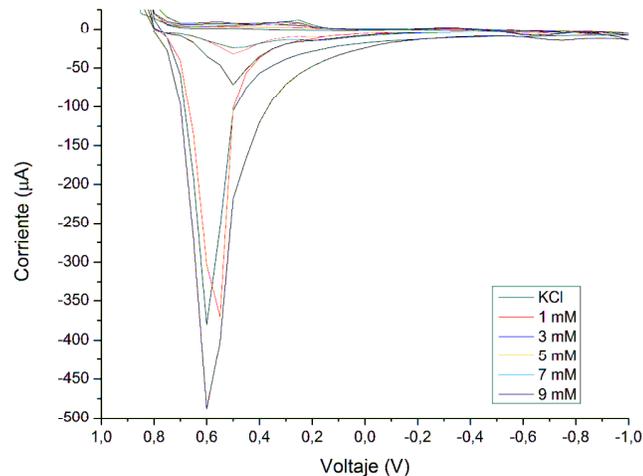


Figura 3-9. Voltametría cíclica de una solución de ferricianuro de potasio con el sensor AC1W1RS (oro) y cloruro de potasio 1 M como bufer

Se pudo observar el efecto del uso de diferentes tipos de sensores y diferentes soluciones electrolíticas en las respuestas obtenidas, demostrando que el sistema es sensible a los diferentes cambios que se realicen en las matrices que se estén analizando. Estos ensayos también permitieron seleccionar estos tres sensores como promisorios para llevar a cabo la evaluación de muestras provenientes del proceso de fermentación de miel de abejas. Los cambios evidenciados en las señales obtenidas se explican por la diferencia en las

características electroquímicas tanto de las soluciones búfer así como el comportamiento del ferricianuro de potasio, las cuales hacen que las reacciones de oxidación y reducción se den a velocidades diferentes sobre las superficies de los electrodos. Es importante tener en cuenta que a pesar que en los tres tipos de sensores se presenta una variación en la curva obtenida dependiendo de la concentración de la solución de ferricianuro de potasio evaluada, el sensor de oro presenta las menores variaciones, lo cual probablemente puede hacer que dicho sensor no brinde información útil del proceso fermentativo para la obtención de hidromieles.

3.3 Ensayos del sistema electroquímico con soluciones modelo

En la tabla 3-2 se pueden observar las soluciones preparadas y los valores medidos para las diferentes variables. En general, se puede observar que existen diferencias entre el pH y la conductividad eléctrica de las muestras y que existen similitudes en los valores obtenidos para las longitudes de onda de mayor absorbancia para las soluciones, así como para el índice de refracción, lo cual fue confirmado por un análisis ANOVA con 95% de confiabilidad. Estos resultados confirman que la espectrofotometría no es una técnica adecuada para el análisis de los diferentes compuestos seleccionados debido a que no todos ellos absorben luz, haciendo imposible observarlos; sin embargo, otros presentaron una absorbancia entre 268 y 282 nm, haciendo que su identificación sea complicada.

Tabla 3-2. Soluciones de sustancias puras utilizadas para ser evaluadas con el sistema electroquímico

Sustancia	Concentración (%P/V)	pH	Conductividad ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	Espectrofotometría	Índice de refracción
Agua	100	6,09	51,6	0	1,331
Etanol	9,468	6,51	2,59	220	1,337
Glicerol	1,400	6,3	3,45	273,5	1,333
Ácido acético	0,150	3,19	233	0	1,332
Acetaldehído	0,010	5,94	3,4	276	1,331
Metanol	0,030	6,66	4,96	271,5	1,331
Acetato de etilo	0,010	8,29	10,82	268,5	1,331
Propanol	0,015	6,99	4,76	282	1,331

Continuación Tabla 3-2 Soluciones de sustancias puras utilizadas para ser evaluadas con el sistema electroquímico

Sustancia	Concentración (%P/V)	pH	Conductividad ($\mu\text{S/cm}$)	Espectrofotometría	Índice de refracción
Alcohol Isoamílico	0,020	6,32	3,04	278	1,331
Isopropanol	0,015	5,87	4,14	271,5	1,332
Ácido tárárico	0,420	2,25	1695	205	1,332
Ácido succínico	0,056	3,33	166,4	0	1,332
Ácido cítrico	0,025	3,08	241	0	1,332
Ácido láctico	0,113	6,38	713	0	1,333
Sacarosa	0,002	7,07	6,13	277	1,331
Fructosa	0,105	6,2	8,12	278	1,332
Glucosa	0,086	6,35	2,65	274	1,332

En las figuras 3-10 a 3-13 se observan los resultados obtenidos con cada uno de los sensores evaluados para cuatro de las sustancias relacionadas en la tabla 3-2: glucosa, etanol, glicerol y ácido acético. El resto de los resultados se presentan en el Anexo G. Como se puede observar, las señales obtenidas para las muestras con cada sensor son diferentes. Este comportamiento fue confirmado por un análisis ANOVA Kruskal Wallis con 95% de confiabilidad. Dichos resultados confirman que el tipo de sensor influye notablemente en la señal obtenida, debido a las diferentes velocidades a las que las reacciones de oxidación y reducción ocurren.

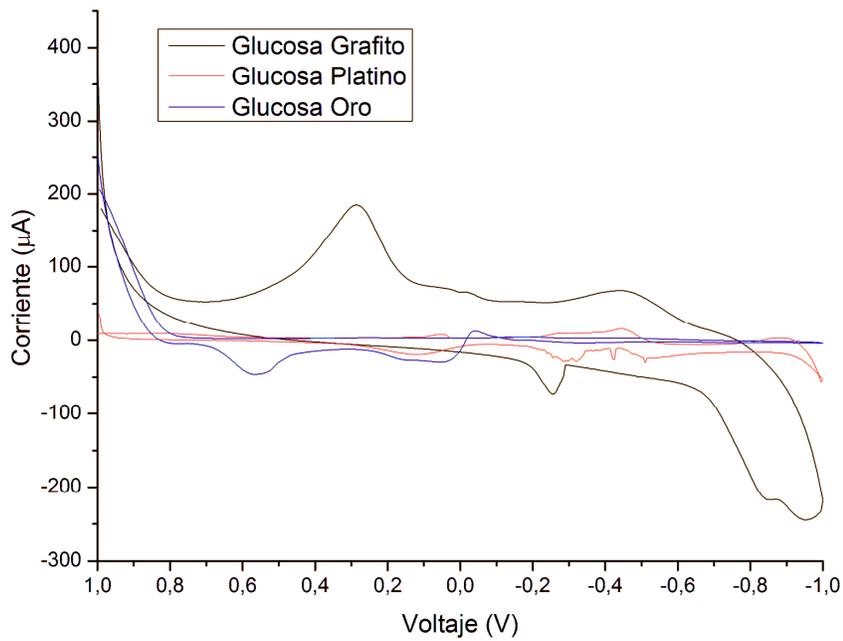


Figura 3-10. Voltametría cíclica para solución de glucosa usando diferentes sensores y cloruro de potasio 0.2 M como búfer

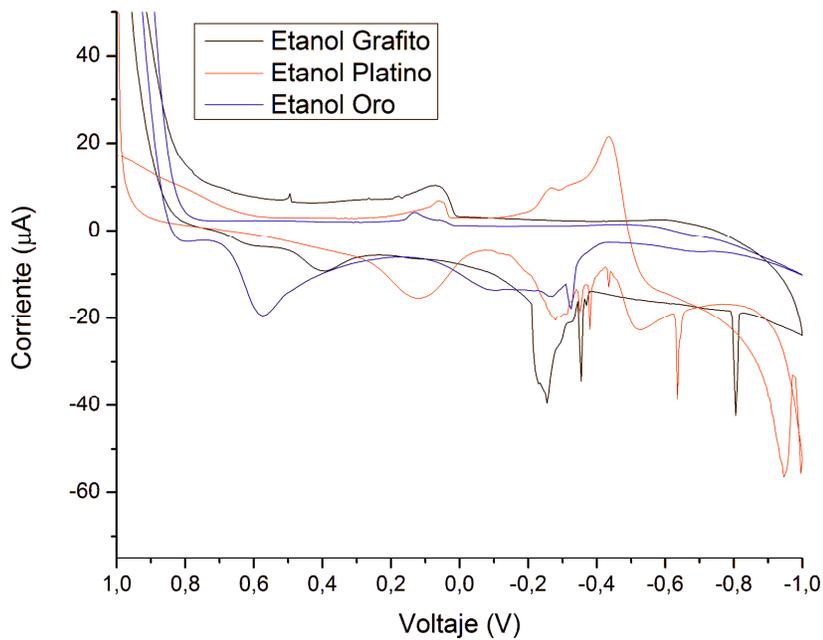


Figura 3-11. Voltametría cíclica para solución de etanol usando diferentes sensores cloruro de potasio 0.2 M como búfer

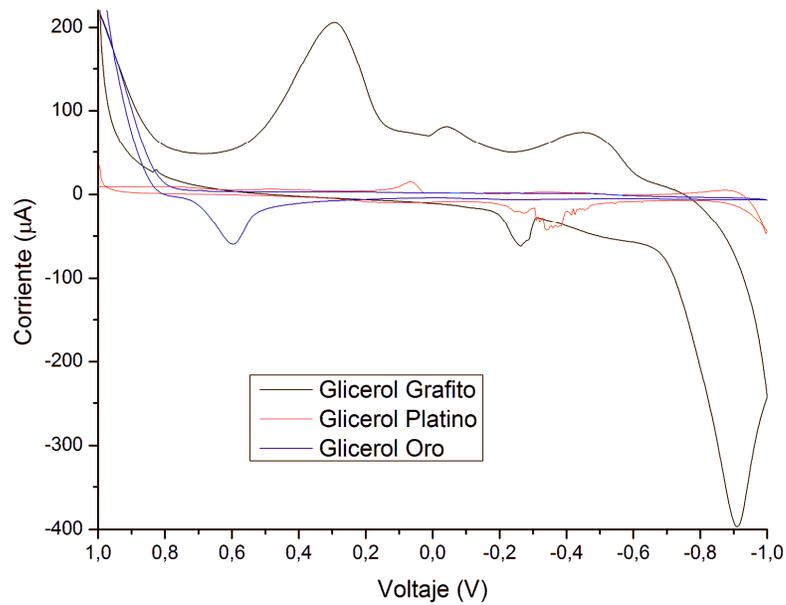


Figura 3-12. Voltametría cíclica para solución de glicerol usando diferentes sensores cloruro de potasio 0.2 M como búfer

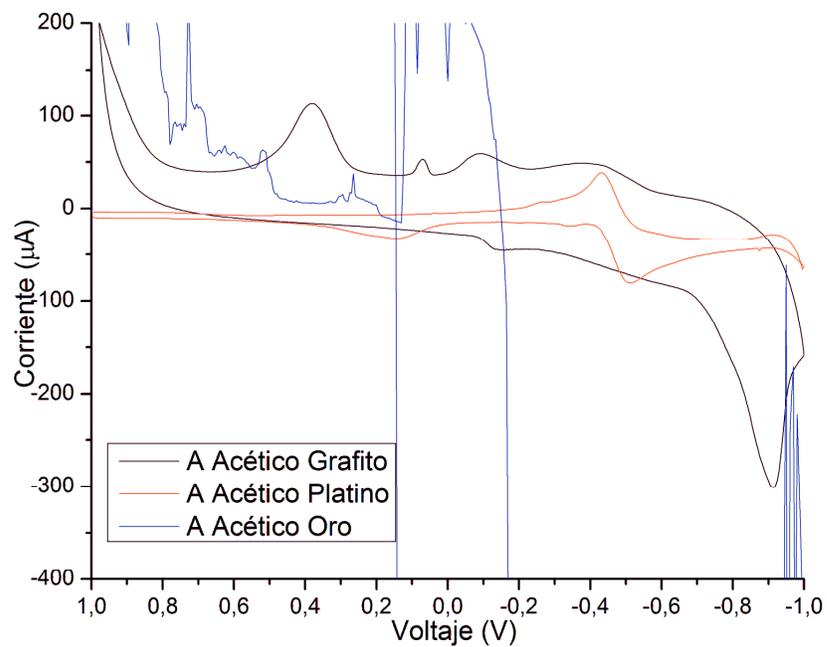


Figura 3-13. Voltametría cíclica para solución de ácido acético usando diferentes sensores cloruro de potasio 0.2 M como búfer

Los resultados observados permiten establecer que es posible diferenciar las sustancias probadas utilizando los tres sensores seleccionados, así como el búfer de cloruro de potasio, sin embargo, debido a las grandes diferencias que se presentan en la señales obtenidas para los diferentes sensores no es posible realizar un análisis más minucioso.

3.4 Ensayos preliminares con muestras reales

3.4.1 Utilización de cloruro de potasio como búfer

Ante lo observado con la sustancia de referencia (ferricianuro de potasio) y las demás sustancias puras evaluadas con los sensores, se procedió a realizar un ensayo en el que se evaluaron con la misma técnica muestras reales: un hidromiel comercial, proveniente de la región del Huila, y dos hidromieles elaborados en el ICTA con la metodología de (Blanco 2012), los cuales contenían sulfato de amonio, y polen como fuentes de nitrógeno, así como una solución modelo de un vino (con etanol al 12% v/v y ácido tartárico 0.033 M, pH 3.6), recomendada por (Kilmartin & Zou 2001). En las figuras 3-14 a 3-16 se pueden observar los resultados correspondientes para cada uno de los sensores evaluados.

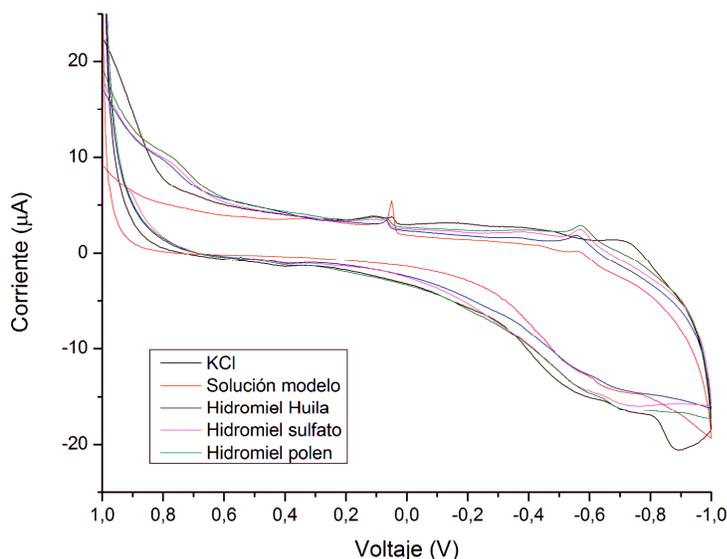


Figura 3-14. Voltametría cíclica de las diferentes muestras analizadas con el sensor AC1W4R1 (grafito)

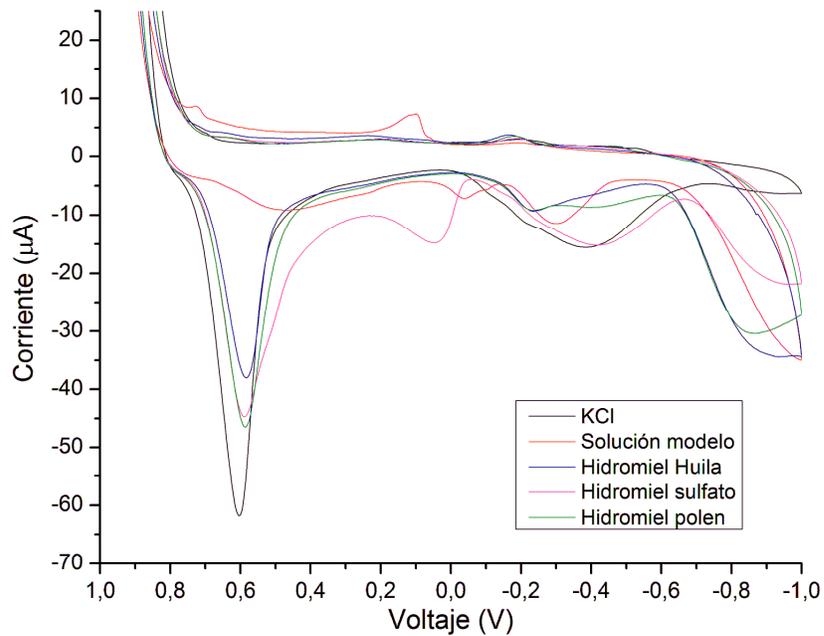


Figura 3-15. Voltametría cíclica de las diferentes muestras analizadas con el sensor AC1W2R1 (platino)

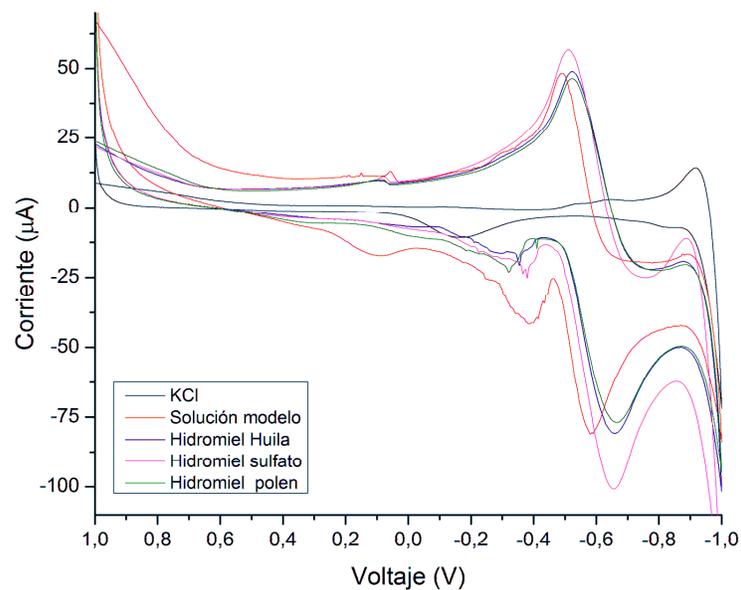


Figura 3-16. Voltametría cíclica de las diferentes muestras analizadas con el sensor AC1W1RS (oro)

Es importante notar que el sensor AC1W4R1 (grafito) presenta señales bastante débiles, pues no hay presencia de los picos característicos de óxido reducción que se obtienen al realizar una voltametría cíclica, mientras que los demás sensores permitieron obtener señales fácilmente diferenciables. Con el sensor AC1W2R1 (platino) se obtienen señales con picos de oxidación y reducción debido a la presencia de diferentes sustancias en las muestras analizadas, que se hacen más evidentes en las señales obtenidas para el sensor AC1W1RS (oro), donde dichos picos se observan claramente para todas las muestras.

Los resultados obtenidos permiten inferir que es posible realizar la discriminación de diferentes muestras reales utilizando voltametría cíclica y diferentes sensores comerciales, utilizando cloruro de potasio como búfer, a pesar de la similitud en composición de cada una de las muestras evaluadas. Pero probablemente la presencia y las diferentes concentraciones de algunas sustancias características de cada una de las muestras evaluadas hacen que sus características electroquímicas varíen

3.4.2 Ensayos sin uso de búfer

Tiwari et al. 2013; Tiwari & Tudu 2012, reportan que es posible lograr la diferenciación de muestras sin la necesidad de utilizar búfer, debido a que ellas contienen diferentes proporciones de diversas sustancias electroquímicamente activas, suficientes para realizar el análisis. Por ello, se realizaron ensayos sin la utilización de esta solución.

En las figuras 3-17 a 3-19 se presentan los resultados obtenidos realizando 15 repeticiones para cada una de las muestras analizadas mencionadas en el numeral 3.4.1 sin solución búfer y para cada uno de los sensores seleccionados. Las señales obtenidas utilizando el sensor de grafito (AC1W4R1) son muy similares entre sí, haciendo que este sensor no brinde información útil al utilizarlo sin solución búfer. En el caso de las señales obtenidas utilizando el sensor AC1W2R1 (platino), éstas son diferentes para todas las muestras analizadas, haciendo que la información que brinde sea útil al realizar la medición directa en la muestra. Estos resultados fueron confirmados con la realización del análisis estadístico, mediante el cual se pudo establecer la diferenciación de las muestras y por tanto, su clasificación. En el caso de los resultados obtenidos para el sensor AC1W1RS (oro), las diferencias obtenidas en la señal son muy débiles.

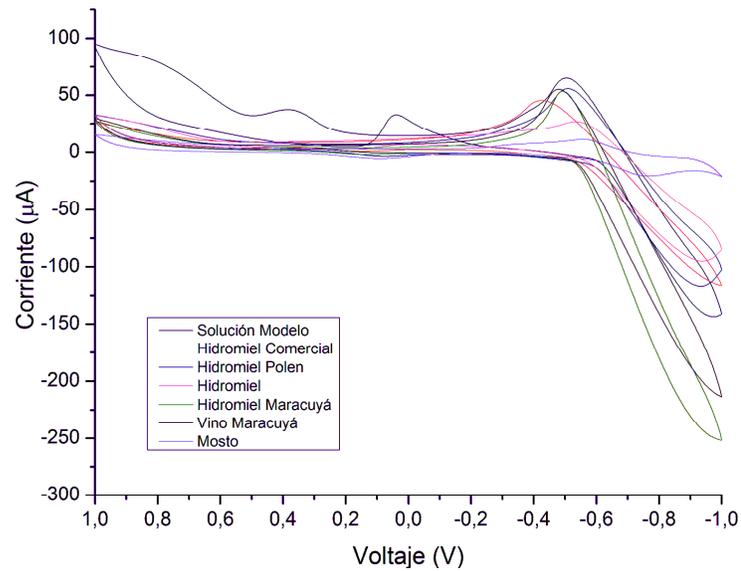


Figura 3-17. Voltametría cíclica para diferentes muestras con el sensor AC1W4R1 (grafito), sin solución búfer

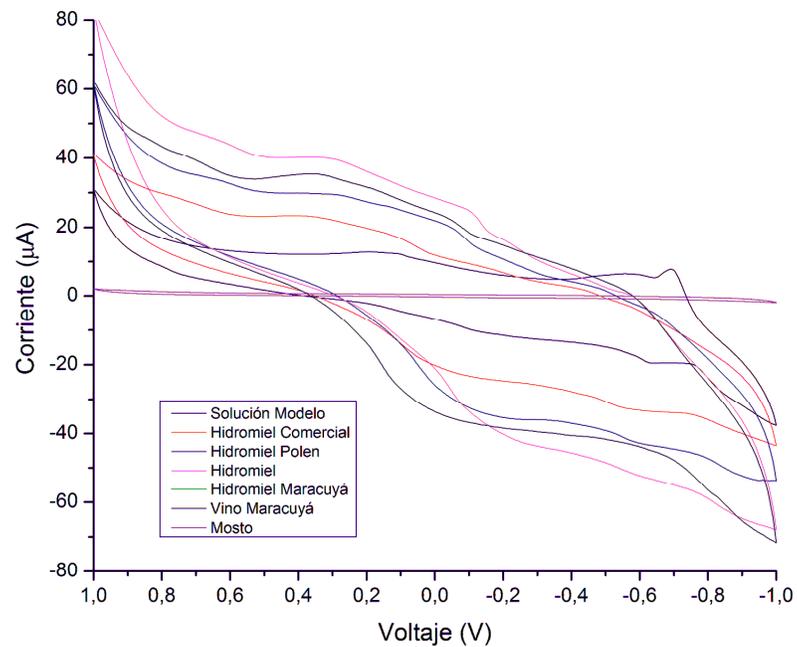


Figura 3-18. Voltametría cíclica para diferentes muestras con el sensor AC1W2R1 (platino) sin solución búfer

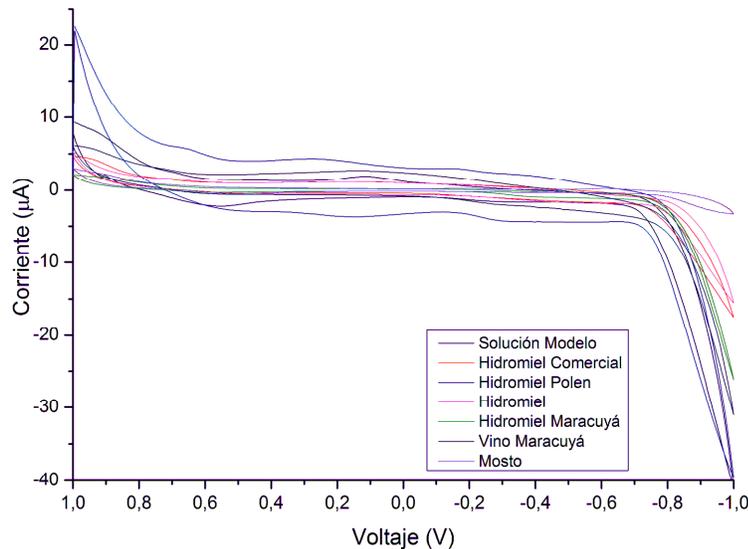


Figura 3-19. Voltametría cíclica para diferentes muestras con el sensor AC1W1RS (oro) sin solución búfer

Adicionalmente, se llevó a cabo el análisis estadístico de estas señales obtenidas aplicando metodologías de reconocimiento de patrones (PARC), que permite proyectar los datos de varios sensores en un plano de dos dimensiones. Este método determina los componentes que mejor representan los datos de acuerdo con un error mínimo cuadrado. En este caso, se llevó a cabo el análisis de dichas mediciones. Las mediciones se almacenaron en un directorio utilizando un programa de archivo de texto, que luego se cargó y procesó mediante técnicas de pre-procesamiento (FFT Fast Fourier Transform) y de normalización) y métodos de reconocimiento de patrones (análisis de componentes principales (PCA)). El método de "Media Centrada" y los valores absolutos de FFT se utilizaron para la matriz de datos antes de realizar la técnica de PCA. Los resultados obtenidos al realizar el PCA permiten ver que hay cuatro grupos diferentes para clasificar las muestras evaluadas.

En la figura 3-20 se presentan los resultados obtenidos mediante el análisis de PCA, que como se mencionó anteriormente, muestra la clasificación en diferentes grupos de acuerdo con las características de las muestras evaluadas, posiblemente debido al contenido de diferentes compuestos provenientes de la fruta, polen, miel, entre otras. Adicionalmente, la solución modelo presenta un comportamiento diferente a las demás muestras debido a que

sólo contiene agua, etanol y ácido tartárico; por su parte, el mosto presenta diferentes características debido a que no presenta ningún contenido de etanol.

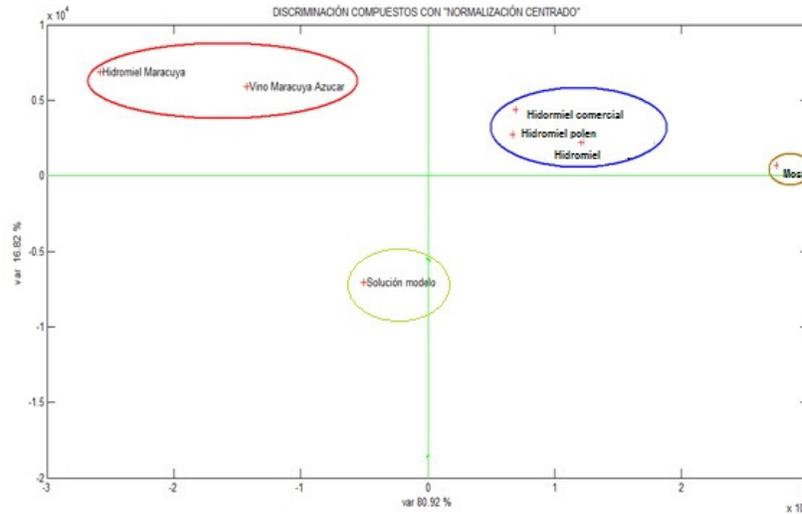


Figura 3-20. Comportamiento del sensor AC1W2R1 (platino) y diferentes muestras analizadas

De acuerdo con los diferentes resultados observados, el sensor de platino fue el que permitió la clasificación de las muestras analizadas; por otro lado, en los numerales 3.4.1 y 3.4.2 se evidencia que el uso de una sustancia que modifique las características electroquímicas del agua (búfer), y que además como referencia, hace que la información que se obtenga a partir de este tipo de sensores sea más homogénea.

Es así como en ambos casos se evidencia que el sensor AC1W2R1 (platino) es promisorio para llevar a cabo las diferentes pruebas que permitan la diferenciación de las muestras de interés para este trabajo de investigación, debido a que permite la obtención de curvas características con la muestra estándar, con diferentes sustancias presentes en la fermentación, con muestras reales utilizando búfer y sin utilizarlo.

En el caso de los sensores de grafito y oro, las señales obtenidas para algunos de los ensayos realizados permiten establecer poca diferenciación, por lo cual su utilización en el monitoreo del proceso puede llevarse a cabo si se realiza alguna modificación *in situ*, directamente sobre el sensor y utilizando otro tipo de soluciones búfer

Adicionalmente, es importante resaltar que es posible llevar a cabo modificaciones de dichos sensores las cuales permiten que se obtengan soluciones útiles para la evaluación de las muestras de interés, como se mencionó en el numeral 2.5.3.

3.5 Electrodo de platino

De acuerdo con los resultados obtenidos en el numeral 3.4, los cuales permitieron observar la diferenciación de muestras reales utilizando el electrodo AC1W2R1 (platino), se llevó a cabo la evaluación de soluciones de diferentes ácidos orgánicos (ácido tartárico, ácido málico, ácido cítrico y ácido acético) con el fin de estudiar el efecto del tipo de ácido y su concentración sobre la señal, de acuerdo con la metodología reportada en el numeral 2.5.2.

En las figuras 3-21 a 3-24 se presentan los resultados obtenidos para la evaluación realizada para los ácidos anteriormente mencionados. Se puede notar que en la zona entre -0.6 V y -0.5 V se presenta un pico en la corriente, el cual se relaciona con la concentración de las soluciones evaluada.

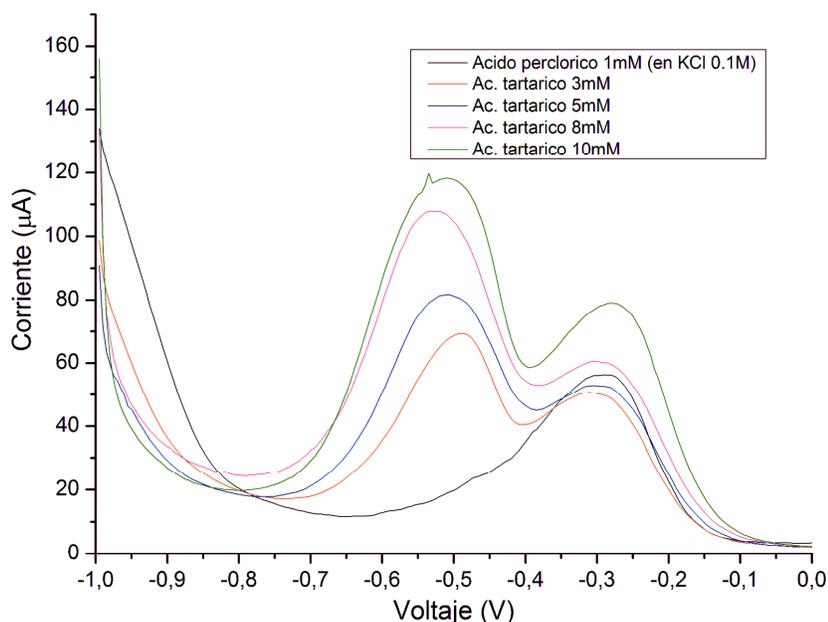


Figura 3-21. Voltametría de onda cuadrada para ácido tartárico, utilizando electrodo AC1W2R1 y ácido perclórico +cloruro de potasio como búfer

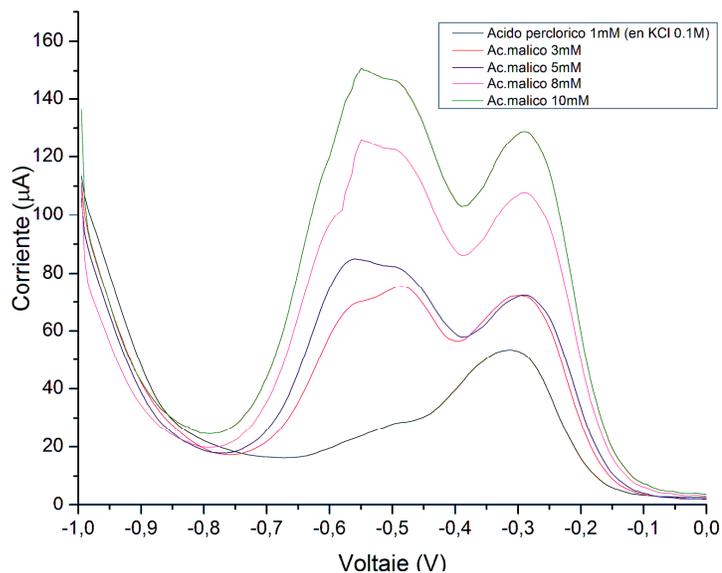


Figura 3-22. Voltametría de onda cuadrada para ácido málico, utilizando electrodo AC1W2R1 y ácido perclórico + cloruro de potasio como búfer

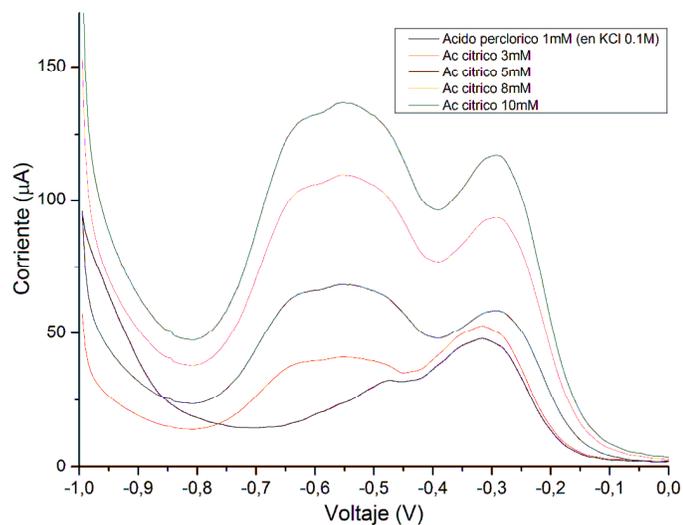


Figura 3-23. Voltametría de onda cuadrada para ácido cítrico, utilizando electrodo AC1W2R1 y ácido perclórico + cloruro de potasio como búfer

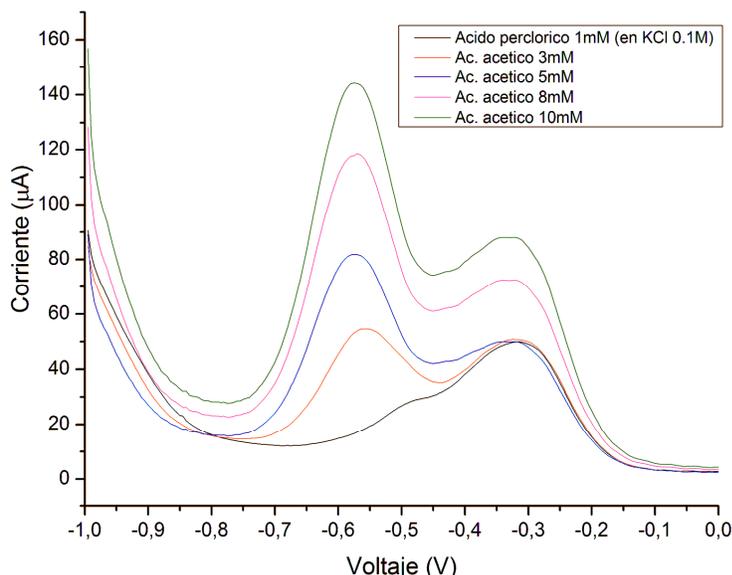


Figura 3-24. Voltametría de onda cuadrada para ácido acético, utilizando electrodo AC1W2R1 y ácido perclórico + cloruro de potasio como búfer

Realizando una prueba de Kruskal-Wallis ANOVA con 5% de significancia, se pudo confirmar que todas las señales obtenidas son diferentes, ratificando la potencialidad de este sensor para la cuantificación de soluciones acuosas de ácidos orgánicos puros; estos resultados posiblemente tienen relación con la estructura de los ácidos orgánicos y su comportamiento de óxido-reducción debido al número de grupos carboxilo que presentan. Sin embargo, cabe notar que la zona de voltaje en la cual se encuentra el pico de cambio de corriente es muy similar para todas, haciendo que sólo se obtenga un pico en el caso del análisis de muestras reales.

Adicionalmente, en la figura 3-25 se presentan los resultados obtenidos para el cambio de corriente contra el voltaje para las soluciones 10 mM de cada uno de los ácidos evaluados, en la cual se evidencia que cada uno de los ácidos analizados presenta una señal diferente, y sin embargo, los picos de respuesta se encuentran en la misma zona, lo cual posiblemente hace que la señal obtenida al analizar muestras reales permita identificar la presencia de ácidos en general, pero no la cuantificación de cada uno de ellos.

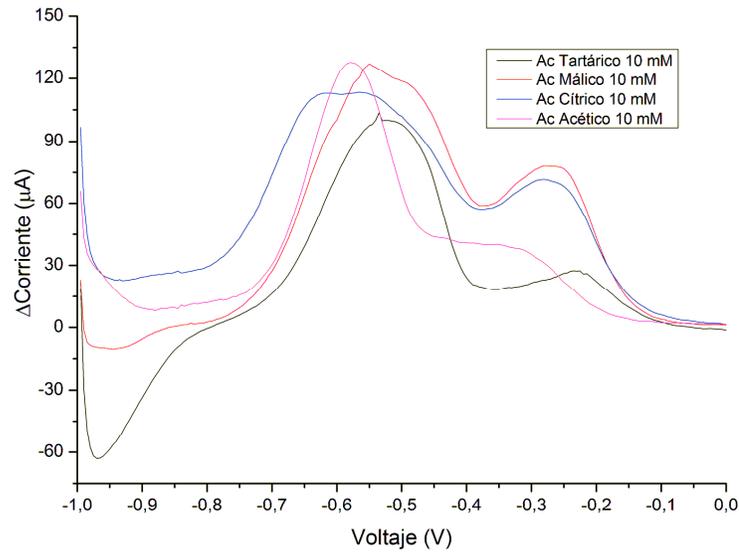


Figura 3-25. Voltametría de onda cuadrada para diferentes ácidos utilizando electrodo AC1W2R1 y ácido perclórico +cloruro de potasio como búfer

En la tabla 3-3, se presentan los resultados obtenidos para las curvas de calibración de cada uno de los ácidos evaluados. Se puede observar que la sensibilidad (pendiente para cada una de las rectas encontradas) para cada ácido es muy similar, lo cual hace posible una correlación con la acidez total de las muestras que se van a evaluar. Estas curvas de calibración se construyeron teniendo en cuenta que existe un cambio de corriente entre la señal que se obtiene sólo con el búfer, y las señales del búfer más cada una de las diferentes concentraciones para cada ácido. Se seleccionó el voltaje en el que dicho cambio de corriente presentó el valor máximo (tercera columna de la tabla 3-3), y se encontró una correlación lineal para cada uno de los ácidos evaluados entre las concentraciones evaluadas, como se presenta en la tabla 3-3.

Tabla 3-3. Curvas de calibración obtenidas para diferentes ácidos orgánicos utilizando electrodo de platino y ácido perclórico + cloruro de potasio como búfer

Sustancia	Intervalo de concentración -nes mM	Voltaje seleccionado para tomar ΔI (V)	Ecuación	Coefficiente de Correlación R^2
Ácido tartárico	0-10 mM	-0.500	$\Delta I = 10,387 * Conc + 2,3481$	0,9945
Ácido málico	0-10 mM	-0.550	$\Delta I = 12,454 * Conc + 2,6184$	0,9934
Ácido cítrico	0-10 mM	-0.600	$\Delta I = 11,599 * Conc - 7,2592$	0,9834
Ácido acético	0-10 mM	-0.550	$\Delta I = 11,800 * Conc - 0,1885$	1.0000

Con los resultados obtenidos para las determinaciones de los diferentes tipos de ácidos orgánicos y diferentes concentraciones de los mismos, utilizando como solución búfer ácido perclórico 1 mM más cloruro de potasio 100 mM es posible cuantificar dichos ácidos en los intervalos de concentración evaluados; sin embargo, las zonas en las que se da el cambio de corriente para todos los ácidos evaluados es la misma, lo cual probablemente hará que sólo se genere un pico al entrar en contacto con las diferentes muestras reales.

De acuerdo con los diferentes resultados obtenidos en los numerales 3.1 a 3.5 para las respuestas obtenidas utilizando diferentes sensores, y considerando adicionalmente, que el costo unitario de cada sensor (grafito (AC1W4R1) y platino (AC1W2R1), € 1.7, oro (AC1W1RS) € 2.0), se puede concluir que los que tiene una mejor relación costo beneficio son los sensores de grafito y de platino.

En vista de que los sensores de grafito no brindaron una señal clara para poder efectuar conclusiones de las muestras evaluadas a continuación se muestra una evaluación acerca de la posible modificación de estos sensores para poder hacerlos más útiles.

3.6 Modificación de sensores

Las modificaciones se realizaron teniendo en cuenta las diferentes referencias de la literatura (Ghodbane et al. 2007; Novakowski et al. 2011; Dini & Snyder 2010), la cual ha sido reportada por diferentes autores, como, se mencionó en el numeral 2.5.3. Dichos cambios se realizan teniendo en cuenta el tipo de muestras que se evaluarán, y generalmente se prefieren las modificaciones *in situ*, las cuales pueden permitir la obtención de señales útiles para llevar a cabo la evaluación de las muestras de interés.

3.6.1 Modificación de sensores de grafito con cobre

De acuerdo con lo descrito en el numeral 2.5.3, se llevó a cabo la modificación del electrodo de grafito de acuerdo con las condiciones establecidas en la tabla 2-11.

▪ Ensayos preliminares para electrodo de carbón vítreo modificado con cobre

Se realizaron determinaciones utilizando las condiciones presentadas en las tablas 2-12 y 2-13, estos resultados se presentan en las figuras 3-26 y 3-27. Realizando un análisis ANOVA Kruskal Wallis, con 95% de confiabilidad se encontró que todas las señales determinadas son diferentes entre sí, lo cual permitirá llevar a cabo la utilización de esta técnica para la evaluación de muestras provenientes de la fermentación, debido a que se pueden relacionarse con las concentraciones de carbohidratos y etanol, presentes en las muestras propias del proceso fermentativo seleccionado. Adicionalmente, al observar los resultados obtenidos en las figuras 3-10 a 3-14, la diferenciación de estas sustancias puras es mayor al realizar la modificación con cobre y la utilización de NaOH.

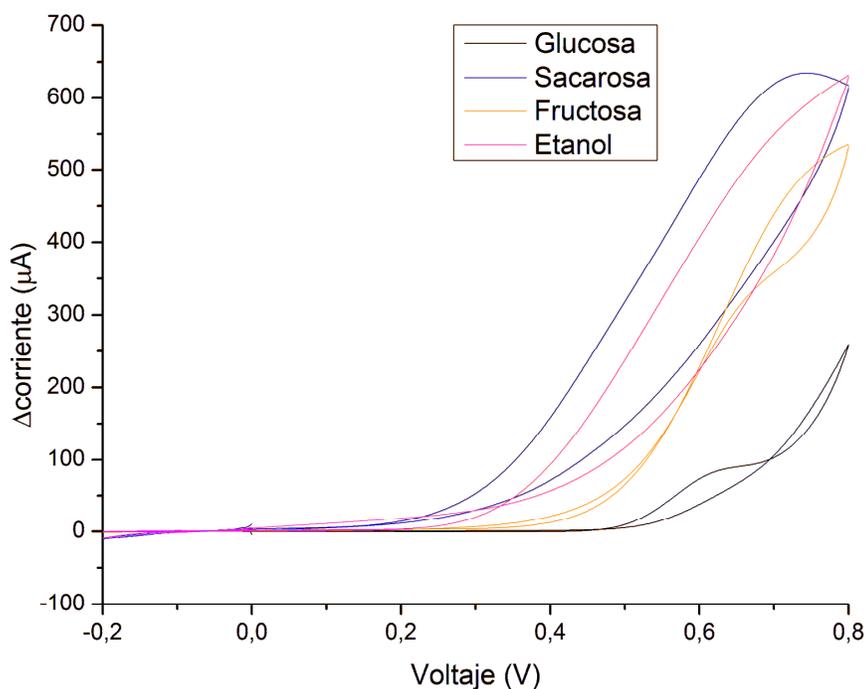


Figura 3-26. Voltametría cíclica para diferentes carbohidratos y etanol con electrodo de carbón vítreo modificado con cobre y medio alcalino

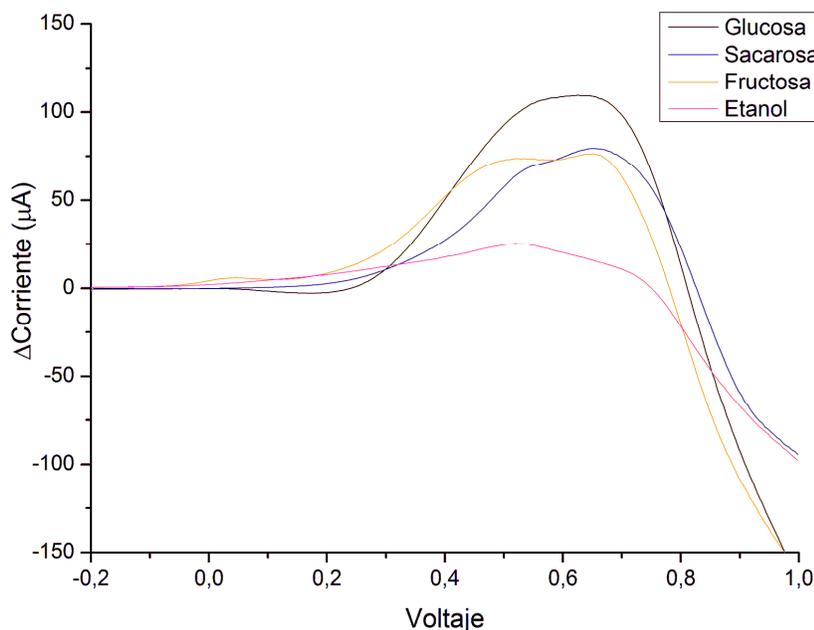


Figura 3-27. Voltametría de conda cuadrada para diferentes carbohidratos y etanol con electrodo de carbón vítreo modificado con cobre y medio alcalino

▪ **Ensayos preliminares para electrodo de grafito (AC1W4R1) modificado con cobre**

Posteriormente, se llevaron a cabo las determinaciones utilizando las condiciones mencionadas en la tabla 2-14 y electrodos AC1W4R1. Dichos resultados, se presentan en las figuras 3-28 y 3-29, donde se puede ver que las señales obtenidas son diferentes, resultados confirmados por el ANOVA Kruskal Wallis, con 95% de confiabilidad, en los que se puede afirmar que todas las señales provienen de poblaciones diferentes. Sin embargo, en el caso de los alcoholes evaluados, la señal obtenida es muy débil, por lo cual la señal obtenida para las muestras reales será debida principalmente a la presencia de carbohidratos y no a la presencia de alcoholes.

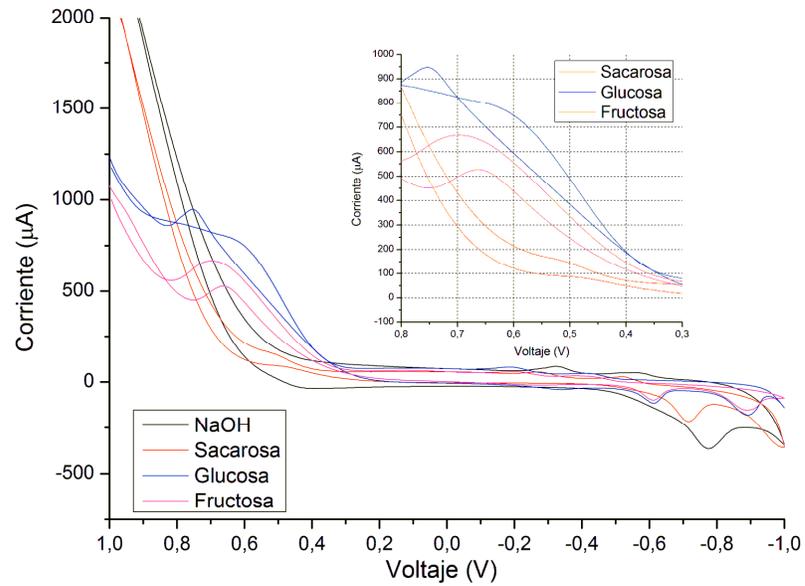


Figura 3-28. Voltametría cíclica para diferentes carbohidratos con electrodo AC1W4R1 modificado con cobre y medio alcalino

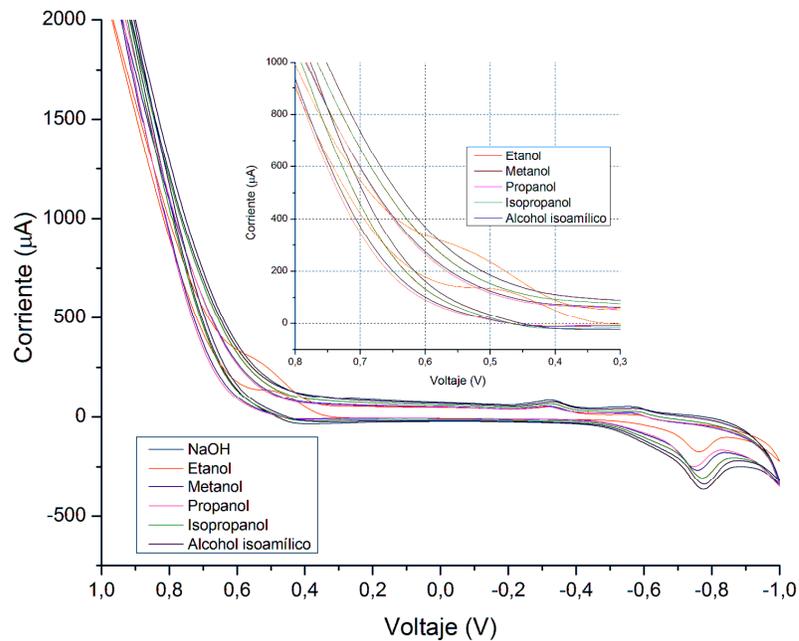


Figura 3-29. Voltametría cíclica para diferentes alcoholes con electrodo AC1W4R1 modificado con cobre y medio alcalino

Los resultados obtenidos por ambos sistemas permiten establecer que este tipo de técnica es aplicable a los compuestos de interés en el sistema de trabajo. Sin embargo, cabe anotar que a pesar que cada una de las señales obtenidas para cada sustancia es diferente, la zona de voltaje en la que se encuentran los valores máximos para el cambio de corriente es la misma, razón por la cual será posible observar sólo un pico al analizar muestras reales.

▪ **Validación de las mediciones obtenidas con el electrodo de electrodo de grafito (AC1W4R1) modificado con cobre**

En las figuras 3-30 a 3-34 se pueden observar los resultados obtenidos para los resultados promedio de cada una de las concentraciones de las soluciones evaluadas.

Debido a que se determinaron las señales de las soluciones a diferentes concentraciones, fue posible realizar la curva de calibración que permite la cuantificación de la concentración de cada una de las sustancias evaluadas. Estas curvas se tienen en cuenta la diferencia de corriente entre la solución de la sustancia menos la solución búfer, contra la concentración de la solución de la sustancia.

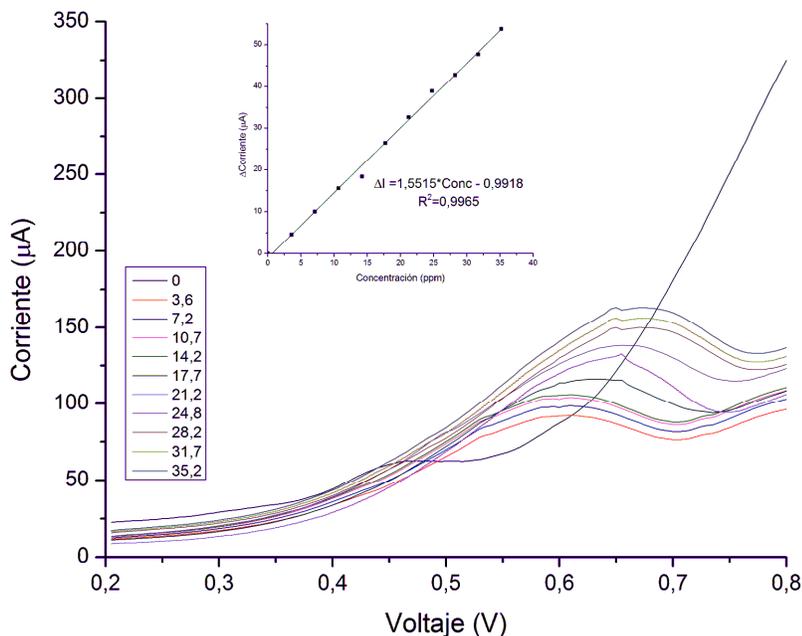


Figura 3-30. Voltametría de onda cuadrada para diferentes concentraciones de glucosa utilizando electrodo AC1W4R1 modificado con cobre e hidróxido de sodio como búfer

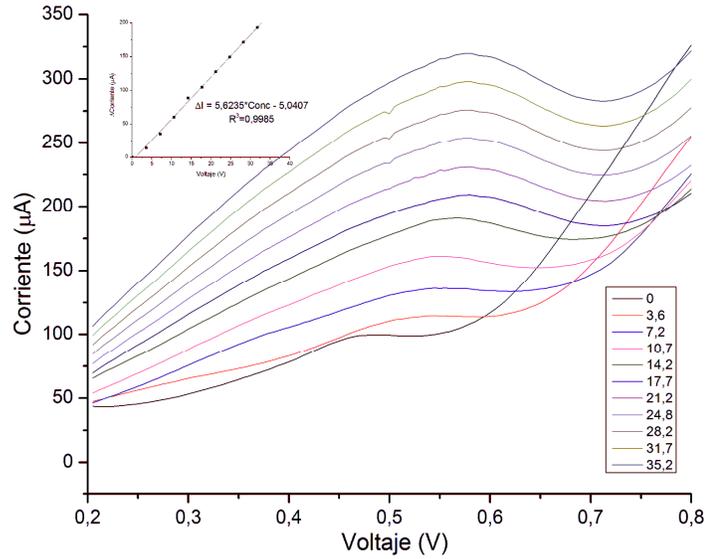


Figura 3-31. Voltametría de onda cuadrada para diferentes concentraciones de fructosa utilizando electrodo AC1W4R1 modificado con cobre e hidróxido de sodio como búfer

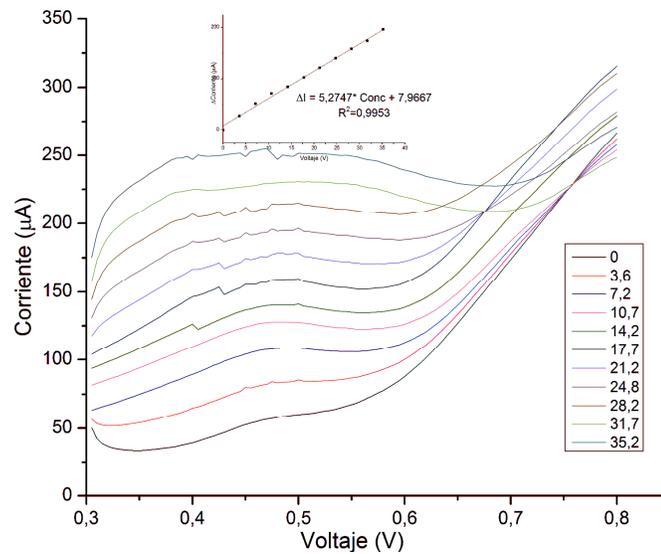


Figura 3-32. Voltametría de onda cuadrada para diferentes concentraciones de sacarosa utilizando electrodo AC1W4R1 modificado con cobre e hidróxido de sodio como búfer

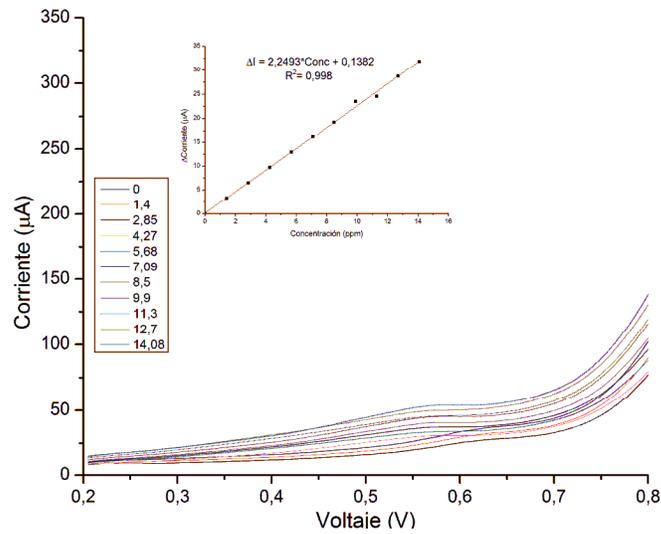


Figura 3-33. Voltametría de onda cuadrada para diferentes concentraciones de glicerol utilizando electrodo AC1W4R1 modificado con cobre e hidróxido de sodio como búfer

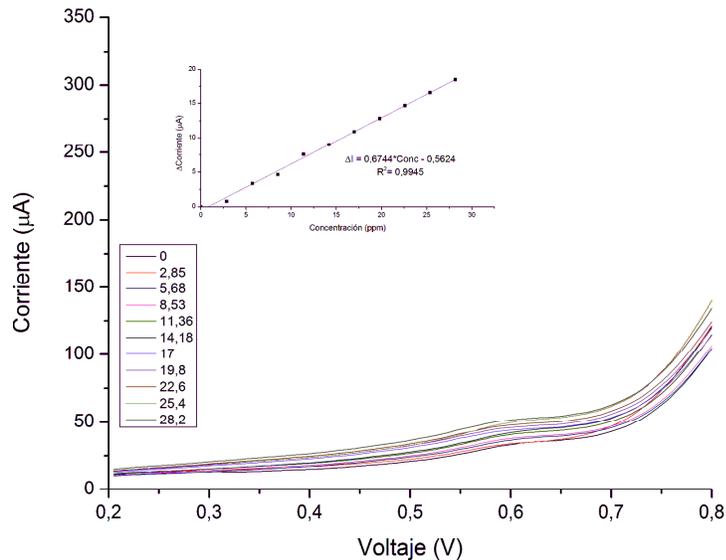


Figura 3-34. Voltametría de onda cuadrada para diferentes concentraciones de etanol utilizando electrodo AC1W4R1 modificado con cobre e hidróxido de sodio como búfer

Cabe resaltar que el coeficiente de correlación para todos los casos fue mayor a 0.99, por lo cual se puede concluir que el uso del electrodo de carbono modificado con cobre en medio alcalino es útil para la determinación cuantitativa en el intervalo evaluado. En la tabla 3-4 se

presentan los resultados obtenidos para cada una de las curvas de calibración de las sustancias evaluadas.

Tabla 3-4. Curvas de calibración de las diferentes sustancias evaluadas con electrodo AC1W4R1 modificado con cobre y NaOH 0.1 M

Sustancia	Intervalo de concentraciones ppm	Voltaje seleccionado para tomar ΔI (V)	Ecuación	Coefficiente de Correlación R^2
Glucosa	0-35.2	0.600	$\Delta I = 1.5515 * Conc - 0.9918$	0.9965
Fructosa	0-35.2	0.500	$\Delta I = 5.6235 * Conc - 5.0407$	0.9985
Sacarosa	0-35.2	0.475	$\Delta I = 5.2747 * Conc + 7.9667$	0.9953
Glicerol	0-14.1	0.550	$\Delta I = 2.2493 * Conc + 0.1382$	0.9980
Etanol	0-28.2	0.600	$\Delta I = 0.6744 * Conc - 0.5624$	0.9945

Es importante notar que el intervalo en el que se encuentran los voltajes a los cuales se pueden encontrar las señales de corriente para las cinco sustancias evaluadas son estadísticamente muy similares, lo cual fue confirmado por una prueba de Kruskal-Wallis; este resultado se tuvo en cuenta para la evaluación de las diferentes muestras reales, debido a que éstas contienen diversas cantidades de las sustancias evaluadas, pero que al ser evaluadas con este electrodo en medio alcalino presentará sólo un pico de corriente, que representará la suma de todas las sustancias presentes. Sin embargo, se puede utilizar esta técnica para la cuantificación de los carbohidratos y alcoholes evaluados en soluciones puras con agua. Estos resultados muestran que la sensibilidad encontrada para las respuestas obtenidas con los electrodos de grafito modificados con cobre es alta para los carbohidratos, haciendo que esta señal prevalezca sobre la de los alcoholes; este hecho permite relacionar la señal obtenida con la presencia de carbohidratos, los cuales disminuyen a lo largo de la fermentación.

3.6.2 Modificación de sensores de grafito con nanotubos de carbono

Como se mencionó en el numeral 2.3.3, es de actual interés la determinación de la actividad antioxidante en diferentes matrices alimentarias; de acuerdo con los resultados obtenidos en los numerales 3.1 a 3.4, se llevó a cabo la modificación de los sensores de grafito, ya que su uso directamente en las soluciones con sustancias puras y con muestras reales no

brinda información suficiente para caracterizar las muestras que se analizan; por ello se utilizaron nanotubos de carbono.

▪ **Ensayos preliminares para electrodo de carbón vítreo modificado con nanotubos de carbono**

En la figura 3-35 se presentan los resultados para los ensayos realizados en el potenciostato marca Metrohm, utilizando las condiciones especificadas en la tabla 2-15. Se puede observar una tendencia similar a la observada para los resultados presentados en la figura 3-33. La correlación encontrada para la curva de calibración se presenta en la tabla 3-5. En este caso, al comparar los resultados obtenidos por el sistema Palmsens y el sistema Metrohm, a pesar que la tendencia de los resultados es similar, es decir, lineal entre la concentración y la diferencia de corriente; se encuentra que la sensibilidad es mayor para la encontrada con el sistema Metrohm, ya que el tipo de electrodo vítreo de carbono modificado es diferente al sensor de AC1W4R1 modificado, y adicionalmente, el área de dicho electrodo es mayor haciendo que la superficie en la cual se lleva a cabo la reacción sea más grande, y por ende, la diferencia de corriente generada también lo sea.

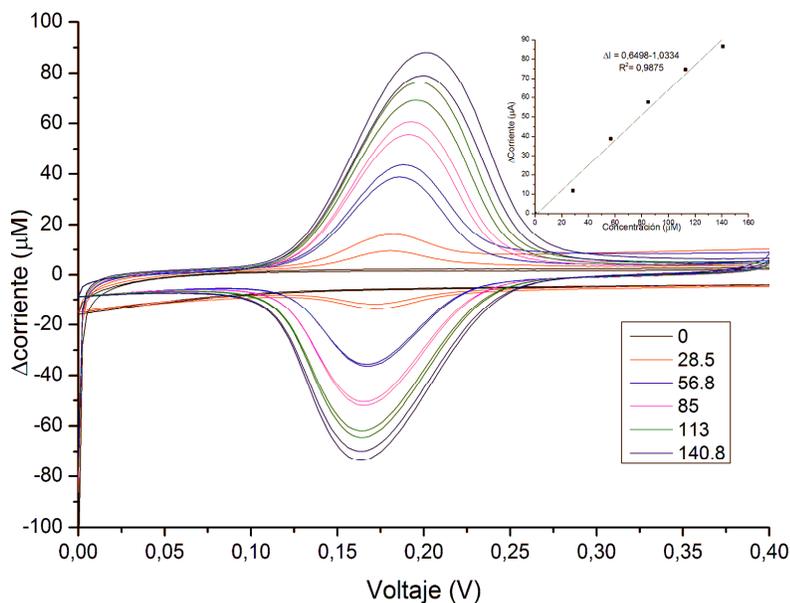


Figura 3-35. Voltametría cíclica para soluciones de ácido cafeico con electrodo de carbón vítreo modificado con nanotubos de carbono y búfer de fosfato de potasio, pH 6 + KCl 0.1 M

Tabla 3-5. Curvas de calibración ácido cafeico, utilizando búfer de fosfato de potasio, pH 6 + KCl 0.1M y electrodo de carbón vítreo modificado con nanotubos de carbono.

Sustancia	Intervalo de concentraciones μM	Voltaje seleccionado para tomar ΔI (V)	Ecuación	Coefficiente de Correlación R^2
Ácido cafeico	0-140	0.200	$\Delta I = 0.6498 * \text{Conc} - 1.0334$	0.9875

- **Evaluación del comportamiento de la señal con la variación de pH para ácido cafeico utilizando electrodo de carbón vítreo modificado con nanotubos de carbono**

De acuerdo con lo descrito en el numeral 2.5.3, se llevaron a cabo ensayos por duplicado para cada una de las determinaciones a pH diferentes. En la figura 3-36 se pueden observar todas las gráficas obtenidas, que permitieron establecer que el comportamiento del sensor modificado con nanotubos de carbono es diferente para cada uno de los casos evaluados. Este resultado fue confirmado realizando una prueba ANOVA Kruskal Wallis, que permitió establecer que cada una de las gráficas obtenidas presenta comportamientos diferentes entre sí, probablemente debido a cambios en la estructura que el ácido cafeico puede sufrir con el cambio de pH.

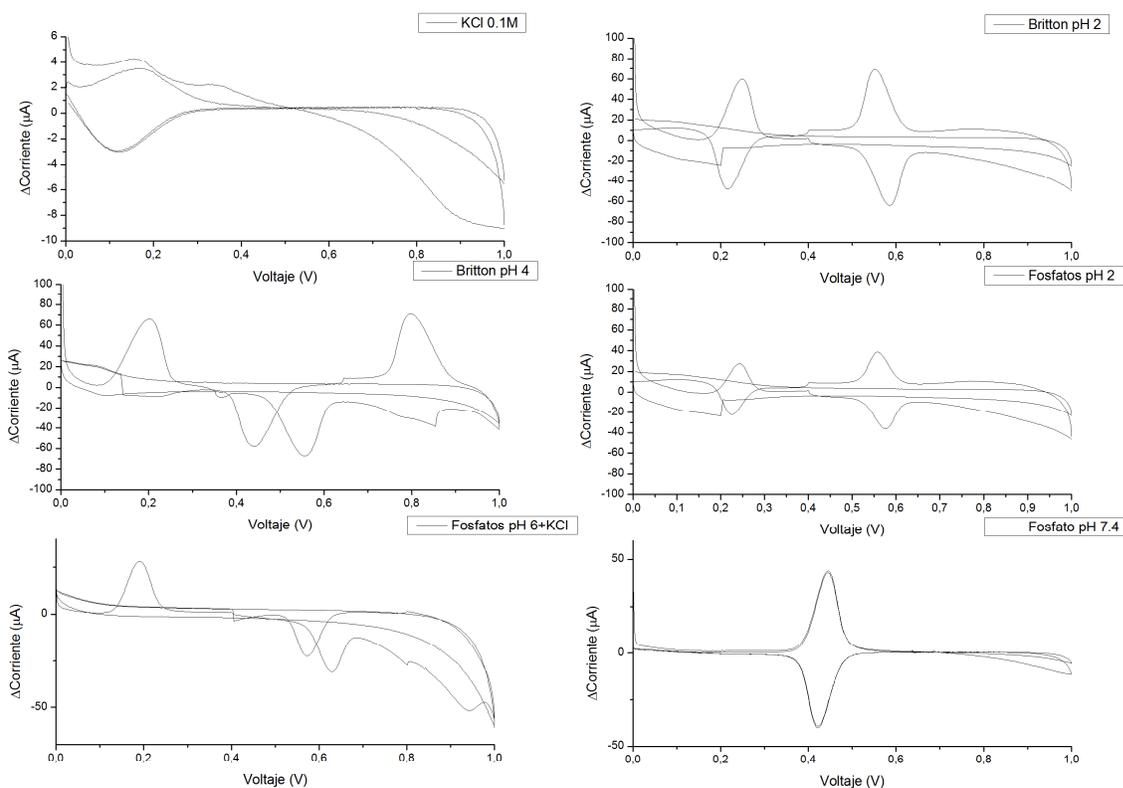


Figura 3-36. Variación de la señal obtenida para una solución de ácido cafeico 58.6 μM , utilizando diferentes soluciones y electrodo de carbón vítreo modificado con nanotubos de carbono

- **Evaluación de muestras reales utilizando electrodo de carbón vítreo modificado con nanotubos de carbono**

En la figura 3-37 se presentan los resultados para diferentes extractos acuosos (miel, polen, ají, clavo y clavo con ají). Se pueden observar que los datos obtenidos son diferentes, los cuales pueden estar relacionados con la presencia de diferentes compuestos antioxidantes en cada uno de estos extractos; en el caso del ají, el compuesto relacionado con la capacidad antioxidante y a su vez con la pungencia es la capsaicina, el cual ha sido reportado como de valor promisorio a nivel de farmacéutico (Manaia et al. 2012); en el caso del polen y la miel, existen diferentes compuestos antioxidantes contenidos en ellos, que se relacionan con su origen botánico, tales como la quercetina, ácido cafeico, flavonoles, ácido

cinámico, entre otros (Almaraz-Abarca et al. 2007); y en el caso del clavo se ha reportado el contenido de eugenol, acetato de eugenilo y alcohol bencílico con alta capacidad antioxidante (Lee & Shibamoto 2001). Cabe notar que las menores señales fueron observadas para los extractos de miel y ají, y los más altos para aquellas muestras que contienen clavo. Estas diferencias estadísticamente significativas se comprobaron con un análisis de Kruskal Wallis con 95% de confiabilidad.

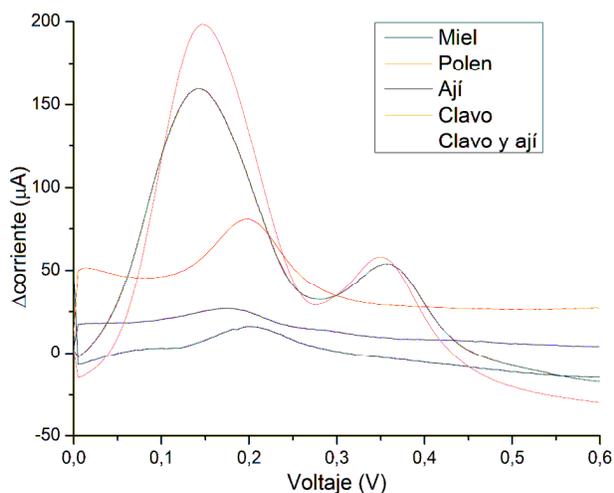


Figura 3-37. Voltametría de onda cuadrada para diferentes extractos acuosos utilizando electrodo de carbón vítreo modificado con nanotubos de carbono y búfer de fosfatos 0.2 M, pH6 + cloruro de potasio 0.1M

En la figura 3-38 se presentan los resultados obtenidos para diferentes mostos e hidromieles, los cuales contenían los extractos evaluados; se observa que las señales obtenidas para los hidromieles son menores que las observadas para los mostos, lo cual puede estar relacionado con la presencia de etanol o con la posible oxidación de los compuestos antioxidantes presentes.

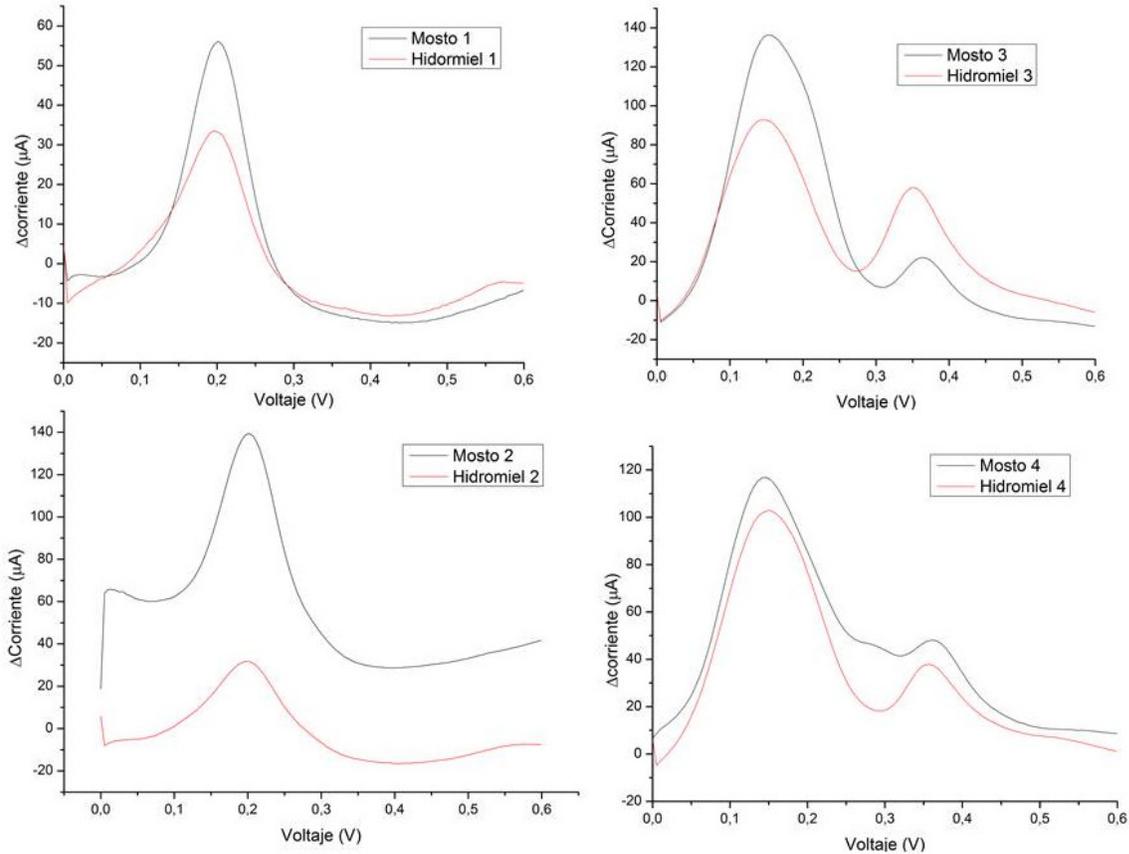


Figura 3-38. Cambio de corriente contra voltaje para diferentes hidromieles y mostos, utilizando electrodo de carbón vítreo modificado con nanotubos de carbono y búfer de fosfatos 0.2 M, pH 6 + cloruro de potasio 0.1 M

En la figura 3-39 se presentan los resultados obtenidos para el mosto 4, el cual está compuesto de extracto de miel, polen, ají y clavo, en diferentes proporciones. En dicha figura se puede observar cualitativamente que la señal obtenida para el mosto 4, refleja la presencia de las cuatro sustancias utilizadas, haciendo que esta técnica pueda utilizarse para la diferenciación de diferentes hidromieles y mostos de acuerdo con su composición, y especialmente, el contenido de sustancias antioxidantes.

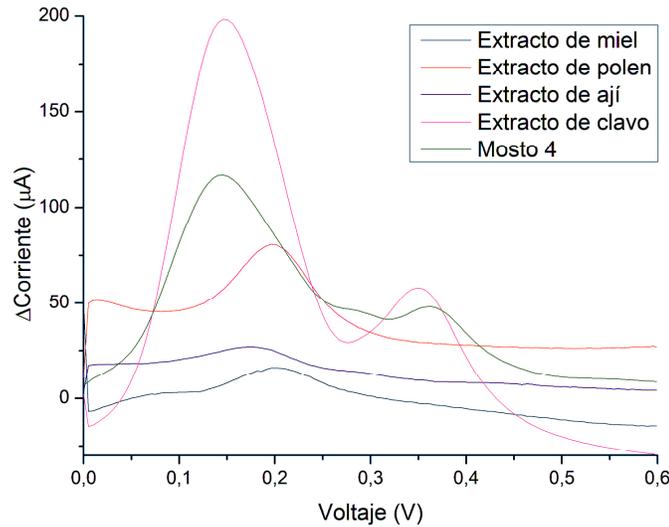


Figura 3-39. Cambio de corriente para mosto 4 y diferentes extractos acuosos, utilizando electrodo de carbón vítreo modificado con nanotubos de carbono y búfer de fosfatos 0.2 M, pH 6 + cloruro de potasio 0.1 M

▪ **Ensayos con el electrodo de grafito (AC1W4R1) modificado con nanotubos de carbono**

Se utilizó la metodología mencionada en el numeral 2.5.3, para lo cual se utilizó el electrodo AC1W4R1. En la figura 3-40 se presentan los resultados obtenidos, en ellos se puede observar que alrededor de 0.25 V se presentan diferentes picos de corriente correspondientes a la oxidación del ácido cafeico; esta corriente varía de acuerdo con la variación de la concentración. En la tabla 3-6 se pueden observar los resultados obtenidos para la correlación de los datos determinados; estos permiten concluir que es posible realizar la determinación de ácido cafeico en soluciones que se encuentren entre 0 y 70 μM , haciendo que la modificación de este tipo de sensores sea promisoria para la determinación de la presencia de compuestos con estructura similar a la del ácido cafeico (compuestos fenólicos).

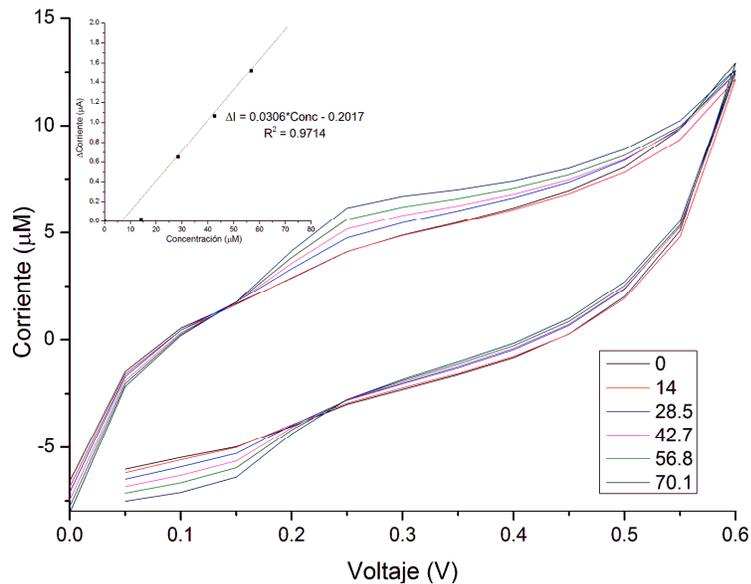


Figura 3-40. Variación de la señal para diferentes concentraciones de ácido cafeico, búfer de fosfato de potasio, pH 6 + KCl 0.1 M y electrodo AC1W4R1 modificado con nanotubos de carbono.

Tabla 3-6. Curva de calibración ácido cafeico, utilizando búfer de fosfato de potasio, pH 6 + KCl 0.1 M y electrodo AC1W4R1 modificado con nanotubos de carbono.

Sustancia	Intervalo de concentraciones μM	Voltaje seleccionado para tomar ΔI (V)	Ecuación	Coefficiente de Correlación R^2
Ácido cafeico	0-70.1	0.250	$\Delta I = 0.0306 \cdot \text{Conc} - 0.2017$	0.9714

▪ **Evaluación de curva de calibración para el ácido cafeico con electrodo de grafito (AC1W4R1) modificado con nanotubos de carbono**

Con estos resultados obtenidos, se llevó a cabo la construcción de la curva de calibración realizando la variación de la concentración entre 0 y 277.8 μM de ácido cafeico, teniendo en cuenta las mismas condiciones para el ensayo expresadas en el numeral 2.5.3 y en la tabla 2-16. En la figura 3-41 se presentan los resultados obtenidos para la curva llevada a cabo, teniendo en cuenta las condiciones de la tabla 2-17. Se observa claramente el comportamiento parcialmente reversible del ácido cafeico, pues los picos para oxidación y reducción van incrementándose con la concentración de la solución. Adicionalmente, fue

posible observar una correlación lineal entre el cambio de corriente y la concentración de la solución, como se presenta en la tabla 3-7. Estos resultados confirman la sensibilidad menor para la determinación de ácido cafeico que presenta el sensor AC1W4R1 modificado, al ser comparado con el electrodo de carbón vítreo, principalmente debido al área del sensor.

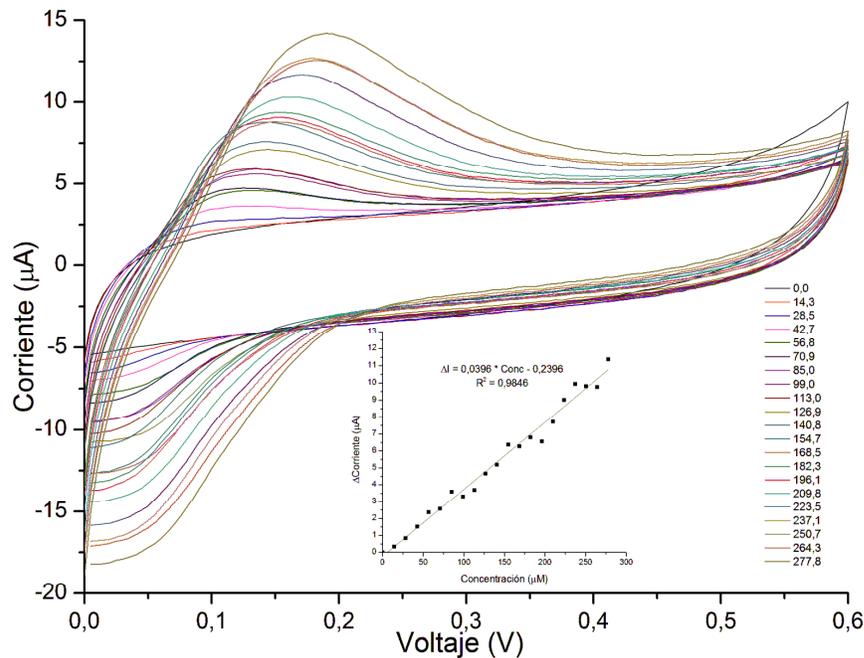


Figura 3-41. Comportamiento de la señal con diferentes concentraciones de ácido cafeico, búfer de fosfato de potasio, pH 6 + KCl 0.1 M y electrodo AC1W4R1 modificado con nanotubos de carbono.

Tabla 3-7. Curva de calibración para ácido cafeico, utilizando búfer de fosfato de potasio, pH 6 + KCl 0.1M y electrodo AC1W4R1 modificado con nanotubos de carbono.

Sustancia	Intervalo de concentraciones μM	Voltaje seleccionado para tomar ΔI (V)	Ecuación	Coefficiente de Correlación R^2
Ácido cafeico	0-277.8	0.1-0.15	$\Delta I = 0.0396 * \text{Conc} - 0.2396$	0.9846

▪ Validación de la utilización de la curva de calibración para el ácido cafeico

Las condiciones mediante las cuales se obtuvieron los resultados para la curva de calibración fueron las especificadas en el numeral 2.5.3. Se llevaron a cabo tres mediciones diferentes en tres días diferentes.

En las figuras 3-42 a 3-44 se presentan los resultados obtenidos para cada uno de los tres ensayos, en los que se observa la variación del cambio de corriente con la concentración de ácido cafeico. A pesar que se observa que la tendencia en los tres casos es la misma, se obtuvieron diferentes curvas de calibración, cuyos resultados se presentan en la tabla 3-8.

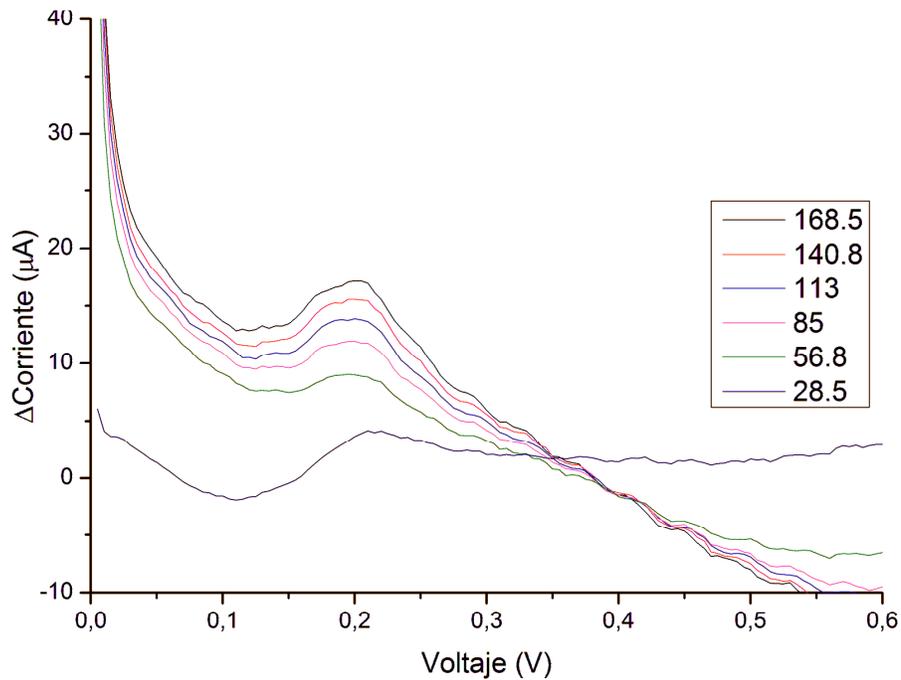


Figura 3-42. Variación de la concentración de solución de ácido cafeico, utilizando búfer de fosfato de potasio, pH 6 + KCl 0.1 M y electrodo AC1W4R1 modificado con nanotubos de carbono, ensayo 1

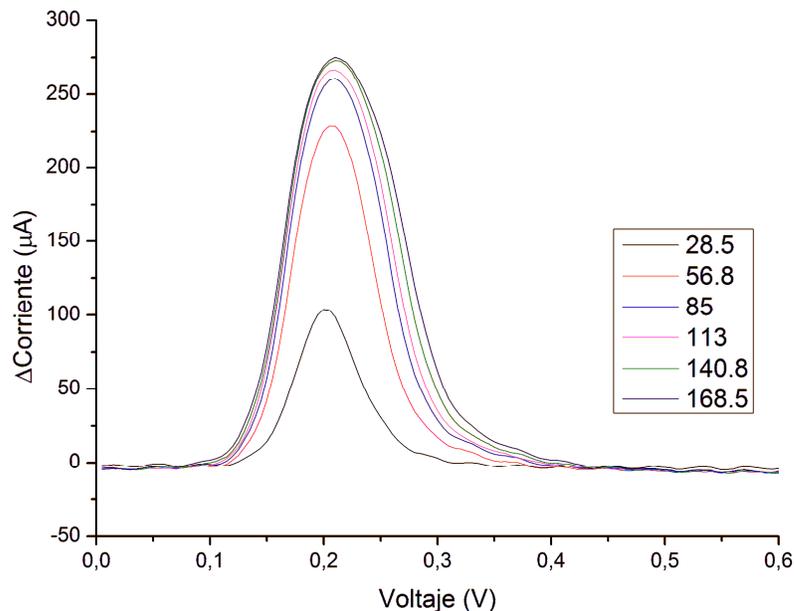


Figura 3-43. Variación de la concentración de solución de ácido cafeico, utilizando búfer de fosfato de potasio, pH 6 + KCl 0.1M y electrodo AC1W4R1 modificado con nanotubos de carbono, ensayo 2

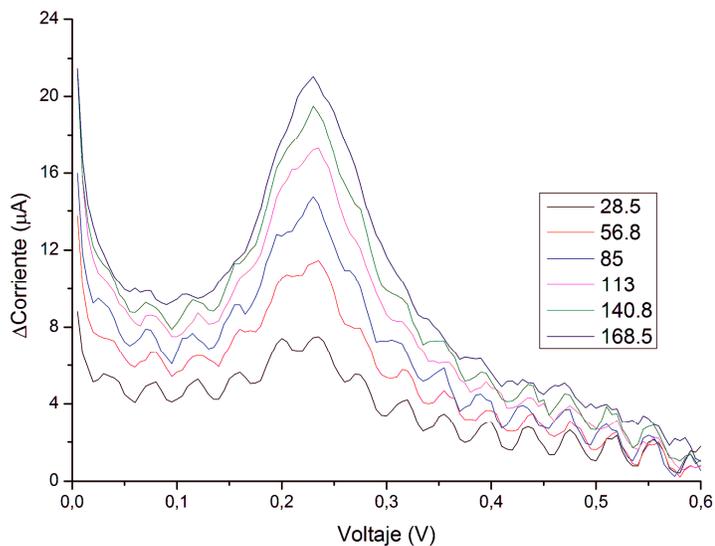


Figura 3-44. Variación de la concentración de solución de ácido cafeico, utilizando búfer de fosfato de potasio, pH 6 + KCl 0.1M y electrodo AC1W4R1 modificado con nanotubos de carbono, ensayo 3

Tabla 3-8. Curvas de calibración ácido cafeico, utilizando búfer de fosfato de potasio, pH 6 + KCl 0.1 M y electrodo AC1W4R1 modificado con nanotubos de carbono.

Ensayo	Pendiente	Ordenada	R ²
1	0.1021	1.5343	0.9500
2	1.4963	71.128	0.7464
3	0.1081	2.1941	0.9601

Los parámetros obtenidos para la ecuación son diferentes, lo cual se confirmó mediante análisis de Kruskal Wallis realizado; por ello, a pesar que se puede observar que se presenta una tendencia similar, el comportamiento en cada uno de los ensayos es distinto.

Esto permite afirmar que es posible identificar la presencia de ácido cafeico con la técnica de modificación utilizada para este tipo de electrodos con la suspensión de nanotubos de carbono, pero éste no puede ser cuantificado. Las variaciones que se presentan para cada uno de los ensayos realizados pueden deberse a la difícil adición de los nanotubos a la superficie del sensor de grafito, pues el diámetro del electrodo es pequeño, y adicionalmente está rodeado por los electrodos de referencia y auxiliar, haciendo que la deposición de dichos nanotubos sea complicada, afectando por lo tanto la señal generada, por lo cual se recomienda utilizar otro tipo de sensores, en el cual el diámetro del electrodo de trabajo sea mayor.

3.6.3 Aplicación de diferentes sensores en el seguimiento de la fermentación alcohólica

Se llevó a cabo una fermentación alcohólica durante 21 días (505,75 horas) a 25 °C, utilizando la metodología explicada en 2.2. Se realizaron mediciones por duplicado. En la figura 3-45 se observan los resultados obtenidos para la diferencia de corriente en el caso de la utilización de cloruro de potasio y nitrato de potasio con el electrodo de platino AC1W2R1. Estas respuestas obtenidas pueden tener relación con la productividad, la concentración de etanol y de glicerol que se genera a lo largo del tiempo, así como con la eficiencia o el rendimiento producto / sustrato.

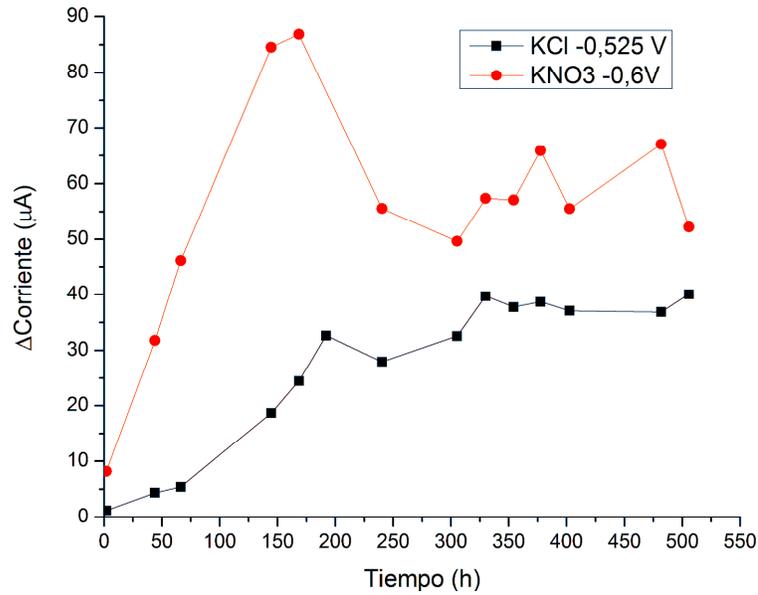


Figura 3-45. Comportamiento del cambio de corriente a lo largo del tiempo utilizando electrodo de platino AC1W2R1, cloruro de potasio y nitrato de potasio

En la figura 3-46 se observan los resultados obtenidos para la diferencia de corriente en el caso de la utilización de ácido perclórico y cloruro de potasio con el electrodo de platino AC1W2R1. Estas respuestas también pueden tener relación con la concentración de etanol, de glicerol y la productividad, que se genera a lo largo del tiempo, así como con la eficiencia o el rendimiento producto / sustrato.

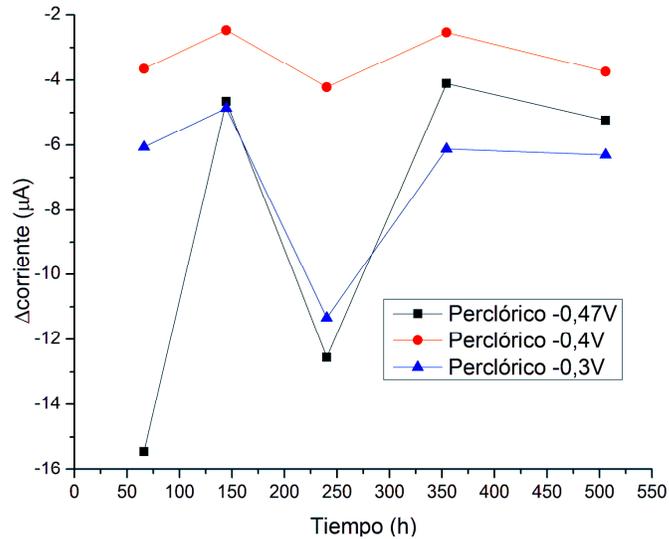


Figura 3-46. Comportamiento de cambio de corriente a lo largo del tiempo utilizando electrodo de platino AC1W2R1 y ácido perclórico + cloruro de potasio

Sin embargo, como se observa el utilizar sólo un tipo de sensor no brinda suficiente información acerca del comportamiento de la fermentación por lo cual se hace necesario el uso también del sensor de grafito modificado con cobre.

▪ Determinaciones fisicoquímicas

Se realizaron mediciones por duplicado de pH, grados Brix, densidad, determinaciones de glucosa, fructosa, glicerol y etanol utilizando HPLC, de acuerdo con lo especificado en el numeral 2.3.4. Estos resultados pueden observarse en las figuras 3-47 a 3-50, los cuales ratifican los resultados obtenidos mediante la utilización del sistema electroquímico, ya que todas las variables cambian a lo largo del tiempo y son significativamente diferentes entre sí.

En la figura 3-47 puede observarse que la tendencia de los grados Brix, azúcares fermentables, glucosa y fructosa es similar, debido a que estos carbohidratos son consumidos por la levadura para llevar a cabo la producción de etanol, glicerol, dióxido de carbono y biomasa; esta tendencia puede observarse en el comportamiento para el etanol y el glicerol, en la figura 3-48.

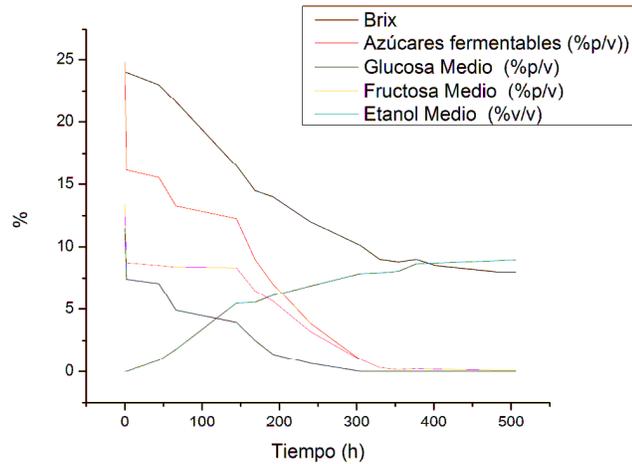


Figura 3-47. Cambio de variables fisicoquímicas a lo largo del tiempo

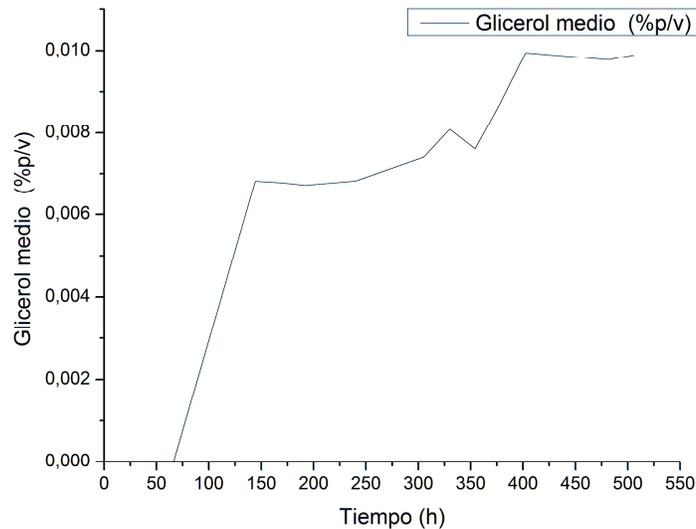


Figura 3-48. Cambio de concentración de glicerol a lo largo del tiempo

Estos resultados observados en la figuras 3-47 y 3-48 se relacionan claramente con los presentados en la figura 3-49, donde se puede evidenciar el grado de conversión para los azúcares, la glucosa y la fructosa; se evidencia adicionalmente que la levadura consume fructosa y glucosa simultáneamente, pero agota la glucosa alrededor de la hora 305. La eficiencia de la fermentación se incrementa con el tiempo de fermentación, llegando a 50%, lo cual quiere decir que a pesar que haya una conversión casi total de los azúcares, sólo se

alcanzó la mitad del rendimiento producto/sustrato, probablemente debido a que la levadura llevó a cabo su crecimiento y la producción de dióxido de carbono.

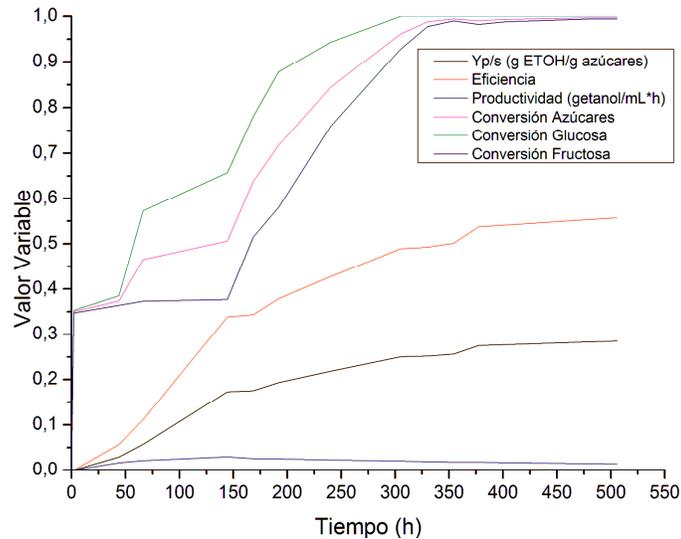


Figura 3-49. Cambio de concentración de variables calculadas a lo largo del tiempo

En la figura 3-50 cuando se observa la evolución de la productividad a lo largo del tiempo, ésta es máxima alrededor de la hora 150, y posteriormente disminuye; esto puede deberse a la inhibición que la levadura pueda sufrir debido a la concentración de etanol que pueda haber en el medio, lo cual hace que la actividad metabólica de la misma sea más lenta.

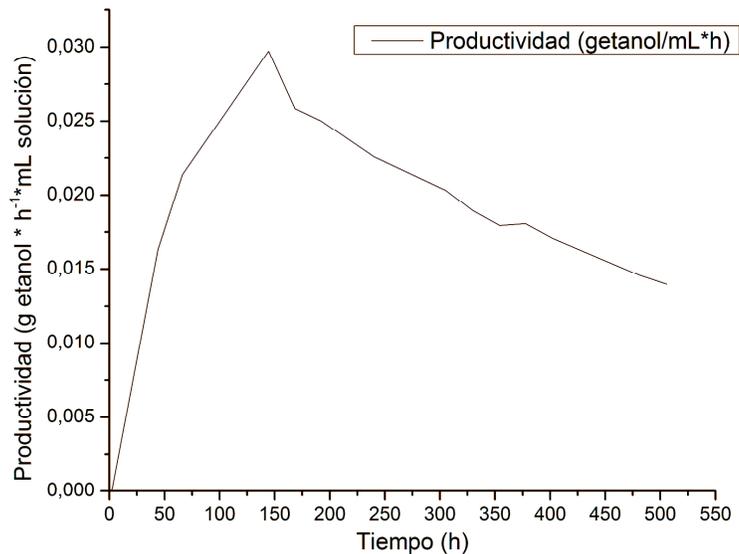


Figura 3-50. Cambio de productividad a lo largo del tiempo

A través de un análisis de componentes principales de los resultados obtenidos para el primer monitoreo de la fermentación, como se presenta en la figura 3-51, mediante el cual se explica el 93.13% de la varianza total de los datos, se observa cómo las variables determinadas se relacionan entre sí, y con las muestras se relacionan con el tiempo de fermentación. Sin embargo, como se muestra en la tabla 3-9 las correlaciones entre las variables determinadas y las señales electroquímicas son bajas, pues son lejanas a 1, lo cual significa que es necesario implementar otras mediciones fisicoquímicas, electroquímicas y sensoriales para poder observar las relaciones que pueden existir entre las variables determinadas a lo largo del tiempo de fermentación.

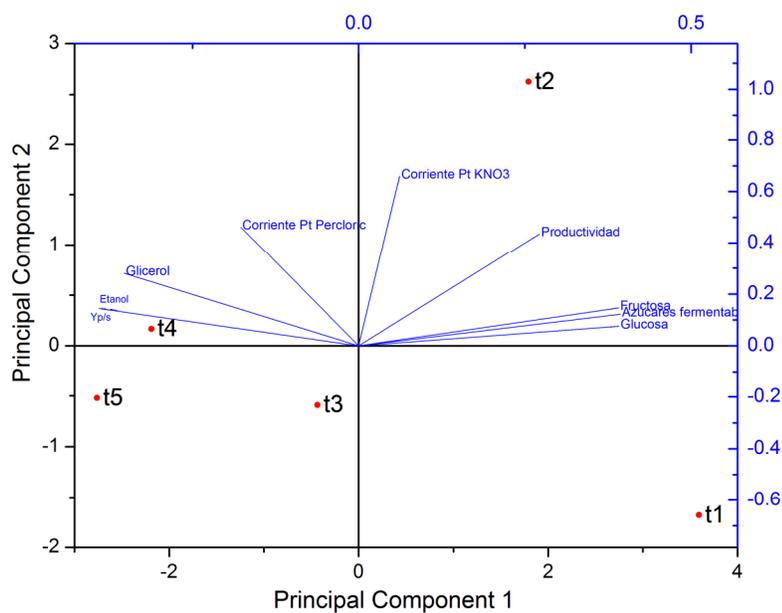


Figura 3-51. Análisis de componentes principales para ensayo de primer monitoreo de fermentación

Tabla 3-9. Matriz de correlación para ensayo de primer monitoreo de fermentación

Variable	ΔI sensor Pt con ácido perclórico (μA)	ΔI sensor Pt con nitrato de potasio (μA)
Corriente Pt Perclórico	1	0.55499
Corriente Pt KNO ₃	0.55499	1
Azúcares fermentables (%p/v))	-0.30123	0.32802
Glucosa	-0.27167	0.24746
Fructosa	-0.31476	0.37004
Glicerol	0.56671	0.2972
Etanol	0.51038	0.07557
Yp/s	0.51038	0.07557
Productividad	-0.00838	0.76578

4. Monitoreo de fermentaciones

De acuerdo con todos los resultados observados en el capítulo 3, las condiciones y los sensores seleccionados, se llevaron a cabo diferentes fermentaciones para su evaluación a lo largo del tiempo, con base en los obtenido en el numeral 3.6.3. Dichas fermentaciones de llevaron a cabo con el fin de comprobar la utilización del sistema de gusto artificial para el seguimiento del proceso fermentativo a lo largo del tiempo, y observar la relación que las señales obtenidas tienen con la composición del mosto inicial y las demás mediciones realizadas con otras técnicas analíticas. Como se mencionó en el capítulo 2, se les adicionó diferentes hierbas, especias o frutas a los hidromieles con el fin de modificar sus características sensoriales. A lo largo de este capítulo puede observarse que las señales obtenidas para cada tipo de fermentación son diferentes, pero en todos los casos fue posible llevar a cabo el seguimiento del proceso utilizando tanto las técnicas analíticas tradicionales como el sistema de gusto artificial.

4.1 Fermentaciones con diferentes tipos de materias primas

En los siguientes ensayos se utilizaron diferentes materias primas, explicadas en los numerales 2.1.1 a 2.1.6. En estas fermentaciones se utilizaron insumos tales como azúcar y miel comercial, con el fin de evaluar el efecto de estos materiales en el desarrollo de la fermentación alcohólica y por lo tanto, las diferencias en las señales obtenidas mediante el sistema de gusto artificial. Estos resultados obtenidos concuerdan con los que se obtienen en el numeral numeral 4.2, los cuales permitieron evidenciar que las señales obtenidas con el sistema de gusto artificial para cada una de las fermentaciones evaluadas es diferente, debido a los insumos utilizados, y la posible presencia de un agente externo que evita que se presente la fermentación alcohólica.

4.1.1 Fermentaciones con evaluación de fuente de carbono, con insumos colombianos

Se llevaron a cabo las fermentaciones utilizando insumos colombianos (miel, azúcar y polen como fuente de nitrógeno), y se utilizaron las condiciones del numeral 2.2 para llevar a cabo la fermentación. En la tabla 4-1 se presentan las condiciones utilizadas. En todos los casos se prepararon los mostos con 25°Brix.

Tabla 4-1. Composición de los mostos evaluados

Mostos iniciales	Nomenclatura
Miel	Mi
Azúcar	Az
Miel comercial Abeja Dorada	Ad

En las figuras 4-1 y 4-2 se presentan los resultados obtenidos para el sensor de platino y el sensor de grafito modificado con cobre (respectivamente). Realizando un análisis de Kruskal-Wallis con 95% de significancia, se encuentra que todas las fermentaciones presentaron un comportamiento diferente a lo largo del tiempo. Esto se relaciona con la composición de cada uno de los mostos, y el perfil de sustancias que se generan dependiendo de los insumos utilizados, lo cual confirma los resultados observados anteriormente, ya que la composición de cada uno de los mostos iniciales influye en el comportamiento en el tiempo que presentan las señales. Es importante notar especialmente en la figura 4-1 las tendencias son muy similares para la miel y el azúcar, sin embargo, para la miel comercial Abeja Dorada, las respuestas obtenidas son diferentes, lo cual se corrobora con los resultados de la figura 4-2.

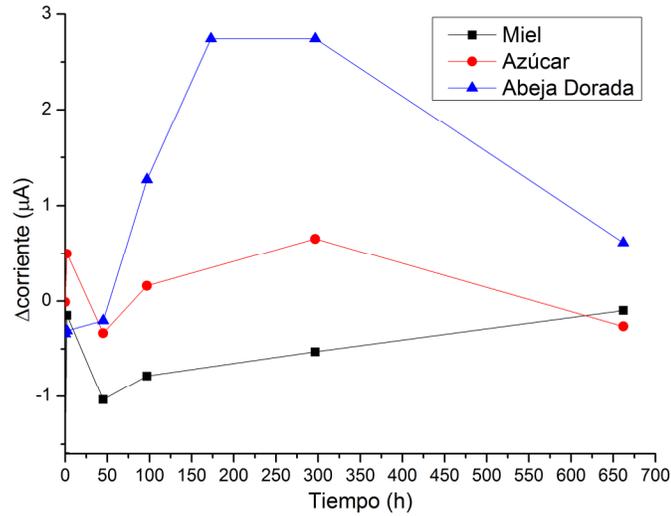


Figura 4-1. Monitoreo de fermentación con diferentes insumos, con electrodo con electrodo de platino (AC1W2R1) y ácido perclórico y cloruro de potasio como búfer

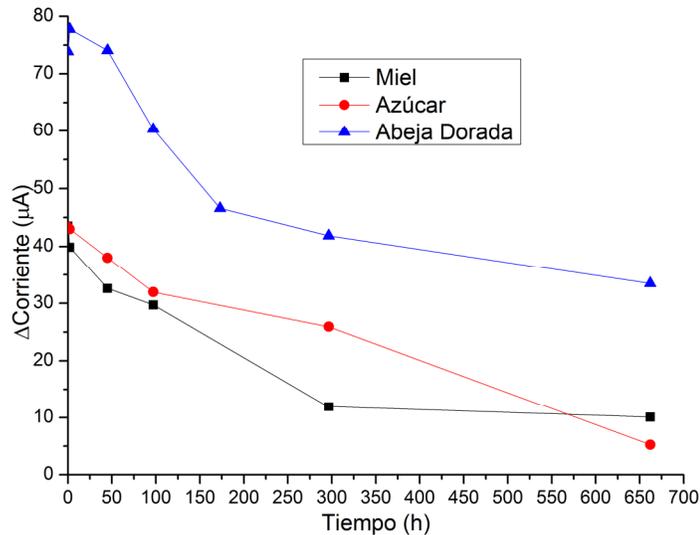


Figura 4-2. Monitoreo fermentación con diferentes insumos, con electrodo de grafito (AC1W4R2) modificado con cobre y NaOH 0.1 M como búfer

En las figuras 4-3 a 4-5 se puede observar el comportamiento para la acidez total, los azúcares totales y el etanol a lo largo del tiempo para las tres fermentaciones evaluadas. Dichos resultados confirman los resultados obtenidos mediante el sistema de gusto artificial, pues cada uno de los mostos fermentados presentó un comportamiento totalmente

diferente, por lo cual se confirman los resultados obtenidos en el numeral 4.2; al utilizar miel de abejas, el consumo de azúcares totales se hace más lento, pero la producción de ácidos se relaciona también con la producción de etanol observada, la cual se da a mayor velocidad para el caso de la miel, probablemente debido a la presencia de sustancias micronutrientes.

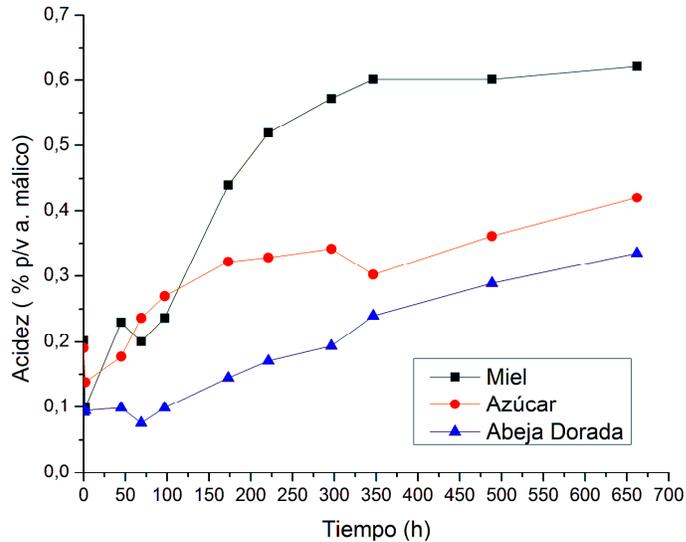


Figura 4-3. Acidez total para fermentaciones con diferentes insumos colombianos

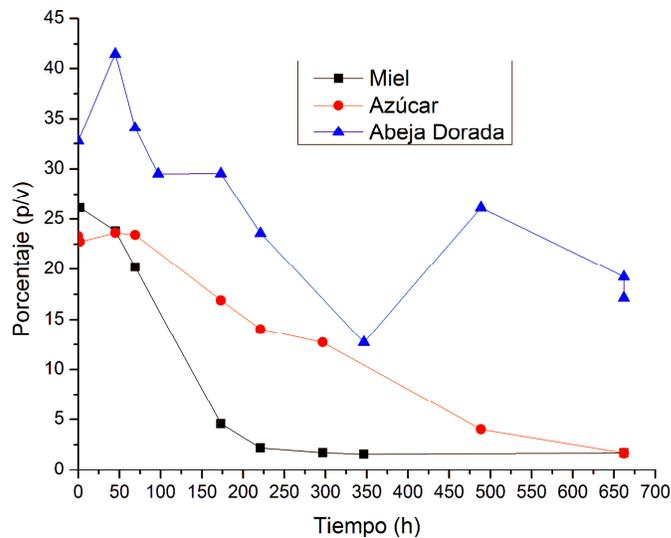


Figura 4-4. Monitoreo de azúcares totales para fermentaciones con diferentes insumos colombianos con HPLC

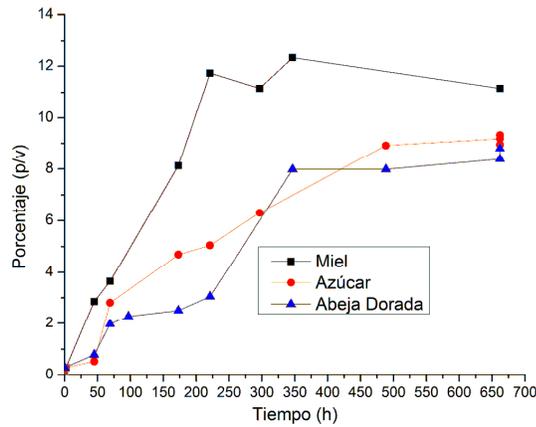


Figura 4-5. Monitoreo de etanol para fermentaciones con diferentes insumos colombianos con HPLC

Realizando el análisis de componentes principales, representado en la figura 4-6 explica el 75,27% de la varianza total de los datos. Adicionalmente, en la tabla 4-2 se presenta la matriz de correlación entre las diferentes variables que se evaluaron, notándose que para este tipo de fermentaciones la señal obtenida mediante el electrodo de cobre presentó mayor correlación con la presencia de carbohidratos, mientras que en el caso de la señal obtenida con el electrodo de platino, presentó correlación baja con todas las variables evaluadas a lo largo del tiempo.

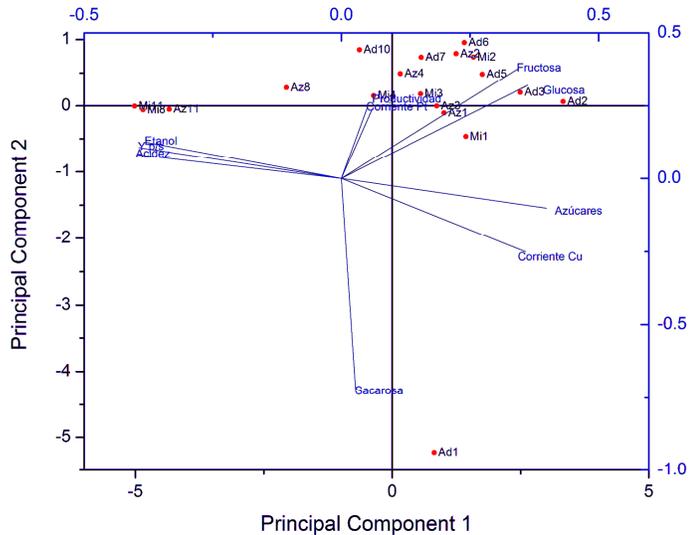


Figura 4-6. Análisis de componentes principales para fermentaciones con diferentes fuentes de carbono e insumos colombianos

Tabla 4-2. Matriz de correlación para fermentaciones con diferentes fuentes de carbono e insumos colombianos

Variable	ΔI sensor Cu (μA)	ΔI sensor Pt (μA)
Azúcares	0.9213	0.1288
Sacarosa	0.3878	-0.1731
Glucosa	0.6477	0.1320
Fructosa	0.5607	0.2103
Etanol	-0.7365	0.0130
Acidez	-0.7996	-0.0718
Y p/s	-0.7736	-0.0393
Productividad	-0.0804	-0.0736
Corriente Cu	1.0000	0.1042
Corriente Pt	0.1042	1.0000

4.1.2 Fermentaciones con evaluación de fuente de carbono, con insumos italianos

En el caso de los insumos italianos, se utilizó miel, azúcar y polen (como fuente de nitrógeno), y las condiciones del numeral 2.2 para llevar a cabo la fermentación. En la tabla 4-3 se presentan las condiciones de cada una de las fermentaciones llevadas a cabo, en las cuales se adicionaron diferentes porcentajes de azúcar a los mostos iniciales de las fermentaciones. En todos los casos se prepararon mostos de 25 °Brix.

Tabla 4-3. Composición de los mostos evaluados

Mostos iniciales	Nomenclatura
Miel	Mi
Miel +10% Azúcar	10% Azúcar
Miel +20% Azúcar	20% Azúcar
Miel +30% Azúcar	30% Azúcar

En la figura 4-7 se presentan los resultados obtenidos para el sensor de carbono vítreo modificado con cobre. Realizando un análisis de Kruskal-Wallis con 95% de significancia, se encontró que todas las fermentaciones presentaron un comportamiento diferente a lo largo del tiempo. La adición de diferentes porcentajes de sacarosa al mosto hace que los perfiles obtenidos sean diferentes, lo cual confirma los resultados observados anteriormente en los que la adición de diferentes materias primas afecta el comportamiento de la fermentación; la señal para el mosto que utilizaba sólo miel pura, presenta valores intermedios al resto de las

señales determinadas. El mosto con 20% de azúcar, presenta valores mayores a lo largo del tiempo al ser comparada con las señales del mosto de miel; sin embargo, el mosto que contiene 30% de azúcar presenta señales más bajas. Esta variación puede deberse al metabolismo que la levadura presenta para cada uno de los mostos evaluados, ya que la adición de sacarosa puede favorecer la velocidad de consumo de azúcares hasta cierto nivel; sin embargo, en el caso del 30% probablemente el exceso de sacarosa puede hacer que se presente una inhibición de sustrato, ya que el consumo de los azúcares para la levadura sea más lento, ya que primero debe hidrolizar la sacarosa y posteriormente, iniciar el consumo de la glucosa y la fructosa; adicionalmente, todas las señales observadas presentaron una tendencia hacia la estabilización a lo largo del tiempo, partiendo de valores cercanos a los 100 mA y llegando a valores menores entre 40 mA and 80 mA.

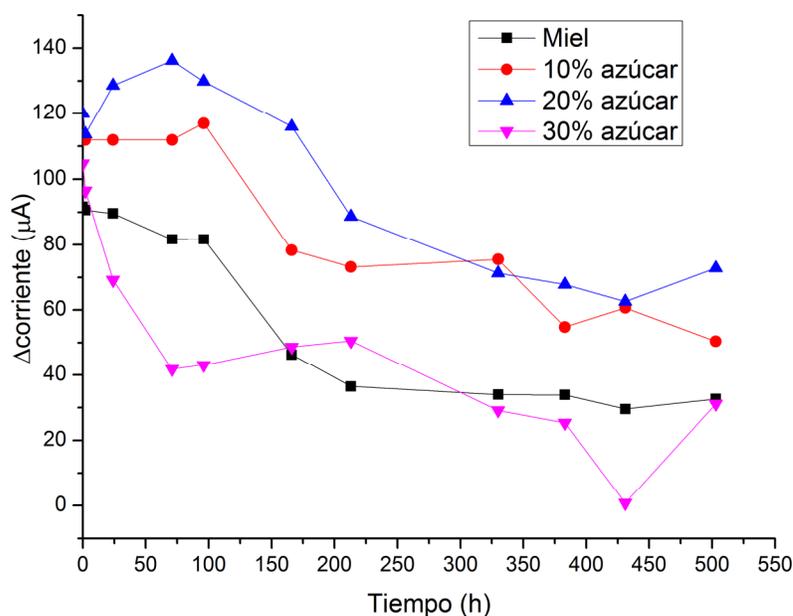


Figura 4-7. Monitoreo fermentación con diferentes porcentajes de azúcar, con electrodo de carbón vítreo modificado con cobre y NaOH 0.1 M como búfer

En las figuras 4-8 a 4-12 pueden observarse los resultados obtenidos para el comportamiento de los grados Brix, acidez total, absorbancia a 267 nm, (la cual tiene relación con la presencia de diferentes ácidos orgánicos) a lo largo del tiempo para las cuatro fermentaciones llevadas a cabo, así como la señal obtenida mediante el FTIR-ATR para los mostos y los hidromieles finales. En todos los casos, se verificó mediante análisis estadístico ANOVA y Kruskal Wallis que el comportamiento para todas las fermentaciones

fue diferente, resultados que confirman lo observado en la figura 4-7, lo cual confirma los resultados obtenidos en los ensayos anteriores, utilizando insumos colombianos, en los cuales también todas las señales obtenidas para el sistema electroquímico fueron diferentes. Esto evidencia la influencia que el tipo de insumos tiene en el comportamiento de la fermentación, lo que también puede ser observado con el sistema de gusto artificial y confirmado por las demás técnicas de análisis seleccionadas.

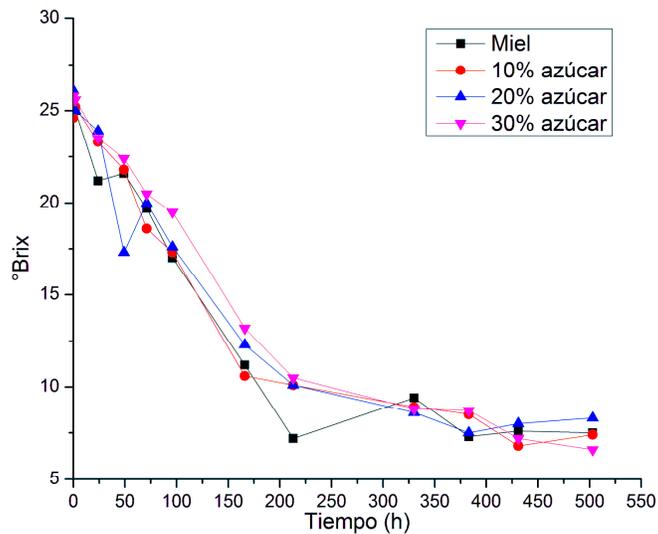


Figura 4-8. Monitoreo de grados Brix para fermentaciones con diferentes porcentajes de azúcar

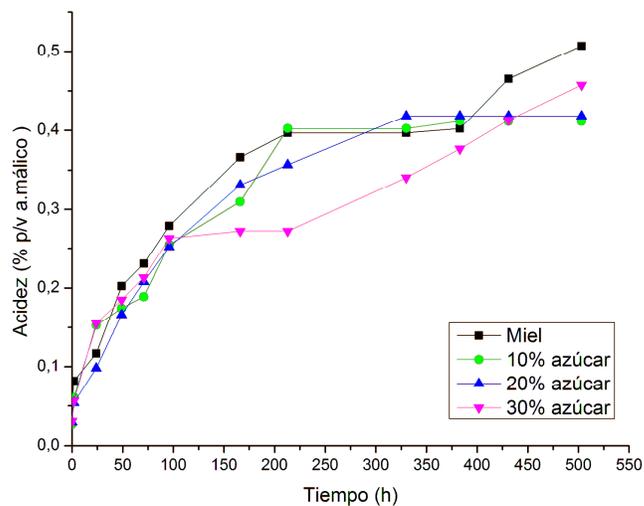


Figura 4-9. Acidez total para fermentaciones con diferentes porcentajes de azúcar

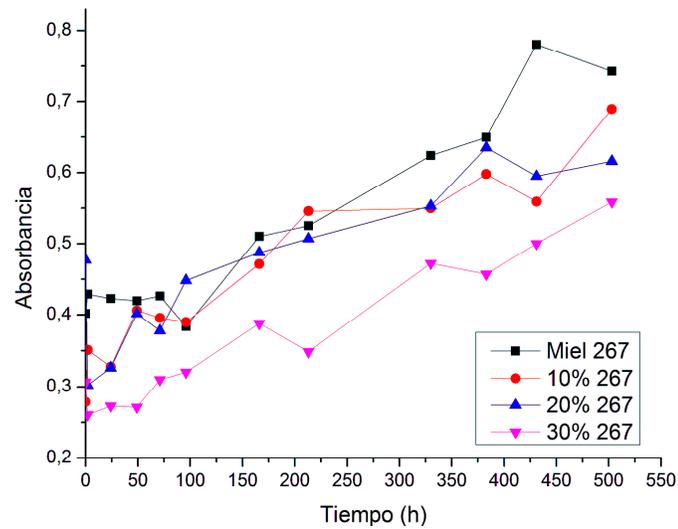


Figura 4-10. Monitoreo de absorbancia a 267 nm para fermentaciones con diferentes porcentajes de azúcar

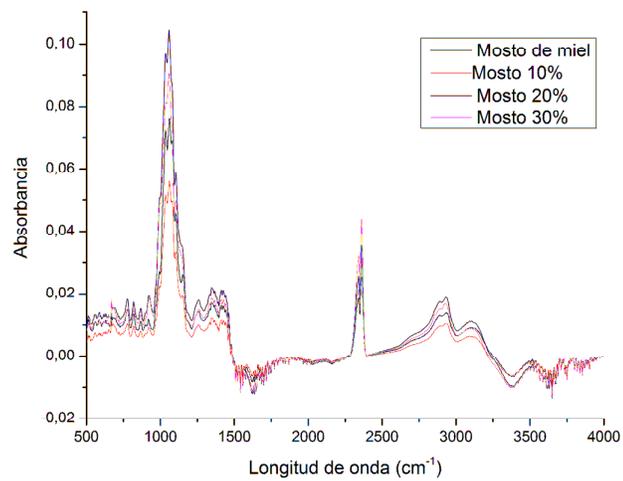


Figura 4-11. Comportamiento de mostos con diferentes porcentajes de azúcar utilizando FTIR-ATR

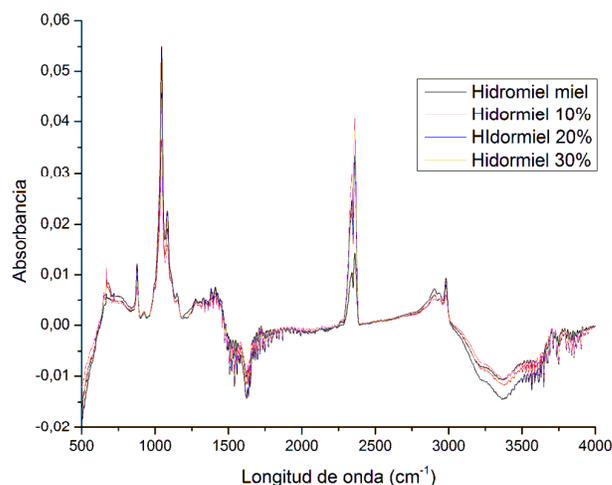


Figura 4-12. Comportamiento de los hidromieles finales con diferentes porcentajes de azúcar utilizando FTIR-ATR

Adicionalmente, se realizó un análisis estadístico de mínimos cuadrados parciales (PLS) con el fin de encontrar la correlación que existía entre los espectros FTIR-ATR obtenidos a lo largo del tiempo con las demás variables determinadas. En la tabla 4-4 se presentan los parámetros encontrados en el análisis. Se evidencia la alta correlación con variables tales como pH, Brix, concentración de etanol, acidez total y absorbancia, teniendo en cuenta los valores para el coeficiente de correlación. Sin embargo, para el caso de la corriente determinada con el electrodo de carbón vítreo modificado con cobre, es baja.

Tabla 4-4. Parámetros para análisis PLS de las variables determinadas y los espectros FTIR-ATR para fermentaciones con diferentes porcentajes de azúcar

Variable	R ²	Error cuadrático medio de validación cruzada	Límite de detección
pH	0,8689	0,114	0,6
Brix	0,9834	0,913	0,62
Etanol	0,9827	0,474	0,62
Acidez total	0,9559	0,0299	0,61
Absorbancia	0,8144	0,0551	0,36
Corriente Cu	0,3992	26	0,074

Los resultados obtenidos en los numerales 4.1.1 y 4.1.2 permiten confirmar la posibilidad de realizar el monitoreo de las fermentaciones utilizando el sistema de gusto artificial, y se puede establecer que cada una de las fermentaciones presenta un comportamiento

totalmente diferente a la otra, lo cual fue confirmado por las demás técnicas analíticas utilizadas para el monitoreo de las mismas.

4.2 Fermentaciones con adición de especias y diferentes insumos

Se utilizaron las materias primas explicadas en los numerales 2.1.1, 2.1.2, 2.1.3, 2.1.4 y 2.1.6.

Se llevaron a cabo las fermentaciones utilizando insumos colombianos e italianos (miel y polen como fuente de nitrógeno), y se utilizaron las condiciones del numeral 2.2 para llevar a cabo la fermentación. Como modificadores se emplearon clavo (*Eugenia caryophyllata*) y ají (*Capsicum annum*) adquiridos en el mercado local italiano. Dichos ensayos se llevaron a cabo en Colombia y en Italia, con el fin de determinar si el uso de miel, polen y agua diferente afectaba el comportamiento de las fermentaciones y por lo tanto, de las señales obtenidas mediante el sistema de gusto artificial.

Se prepararon cuatro mostos diferentes, los cuales contenían clavo, ají y combinación de ambos. En todos los casos, el mosto tenía 24 °Brix y 0.3986% de polen. Estos mostos se compararon con el hidromiel tradicional. En la tabla 4-5 se pueden observar cada una de las fermentaciones realizadas.

Tabla 4-5. Composición de los mostos evaluados

Nomenclatura	Mostos iniciales	Especia (% p/v)
1	Mosto sin adiciones (Patrón o Blanco)	0.0000%
2	Ají	0.4886%
3	Clavo	0.7387%
4	Ají Clavo	0.4876% 0.7313%

4.2.1 Fermentaciones con insumos colombianos

En las figuras 4-13 y 4-14 se presentan los resultados obtenidos para el sensor de platino y de grafito modificado con cobre (respectivamente) para las fermentaciones realizadas con los insumos colombianos, donde 1, 2, 3 y 4 representan a cada uno de los mostos presentados en la tabla 4-5. Realizando un análisis de Kruskal-Wallis con 95% de significancia, se encuentra que todas las fermentaciones presentaron un comportamiento

diferente a lo largo del tiempo, lo cual se relaciona posiblemente con la composición de cada uno de los mostos y su cambio a lo largo del proceso fermentativo. Estos resultados confirman los resultados obtenidos en el numeral 4.3, ya que evidentemente la composición de cada uno de los mostos afecta el comportamiento de las señales obtenida mediante el sistema de gusto artificial; adicionalmente, el metabolismo de la levadura puede afectarse debido a la presencia de diferentes compuestos en el mosto.

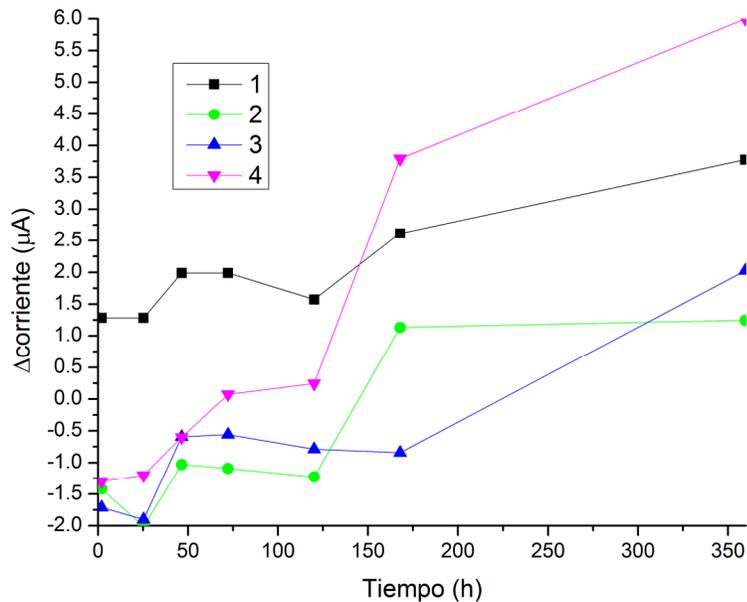


Figura 4-13. Monitoreo de fermentación con adición de especias e insumos colombianos con electrodo de platino (AC1W2R1) y ácido perclórico y cloruro de potasio como búfer

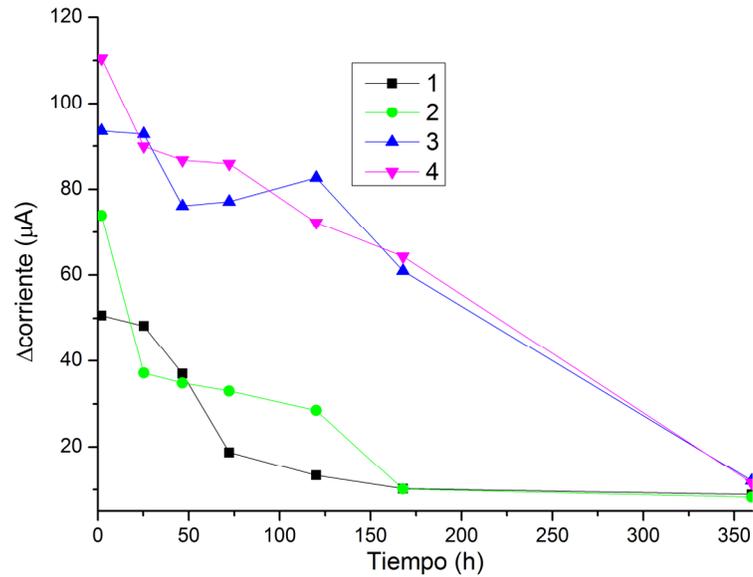


Figura 4-14. Monitoreo de fermentación con adición de especias con electrodo de grafito (AC1W4R2) modificado con cobre y NaOH 0.1 M como búfer

En las figuras 4-15 a 4-18 se puede observar el comportamiento para la acidez total, los azúcares totales, el etanol y glicerol. Es importante tener en cuenta que al realizar un análisis ANOVA con 95% de confiabilidad se confirmó que el comportamiento de cada una de las fermentaciones es diferente, así como se observó en las figuras 4-13 y 4-14. El consumo de azúcares totales está ligado también a la producción de acidez total, etanol y glicerol, pero probablemente las velocidades de producción de dichas sustancias es diferente para cada una de las fermentaciones evaluadas, lo cual evidencia que la adición de agentes modificadores de las características sensoriales afectan notablemente el comportamiento de la levadura.

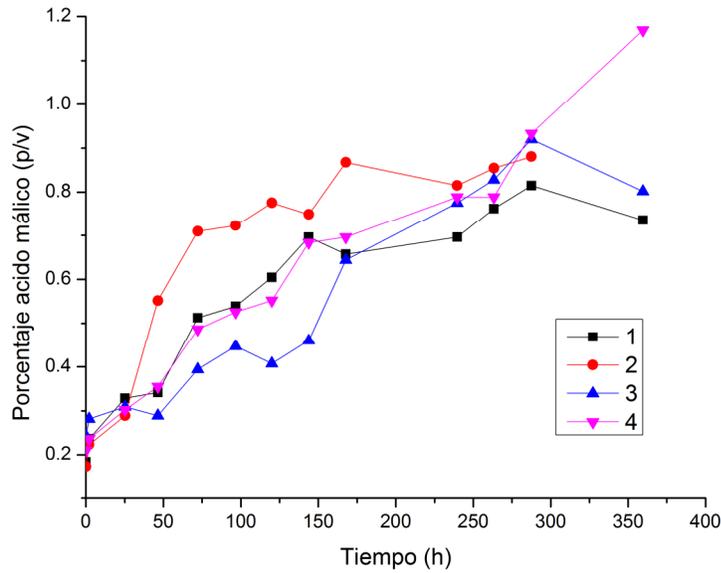


Figura 4-15. Acidez total para fermentación con adición de especias e insumos colombianos

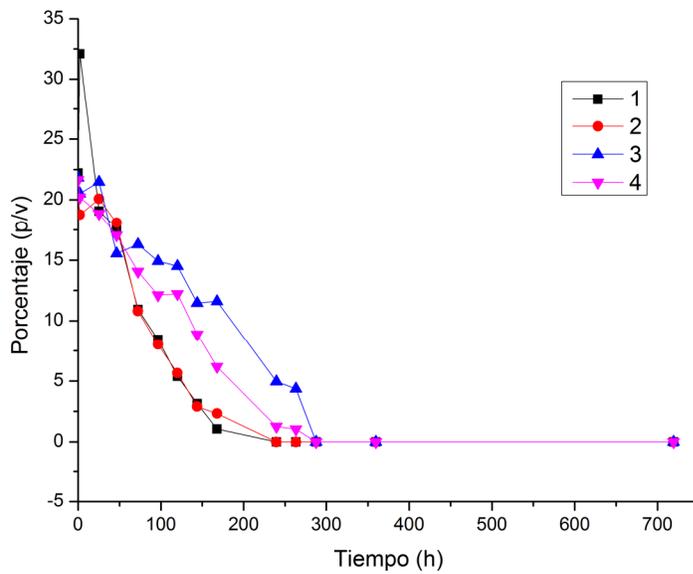


Figura 4-16. Consumo de azúcares totales para fermentación con adición de especias e insumos colombianos con HPLC

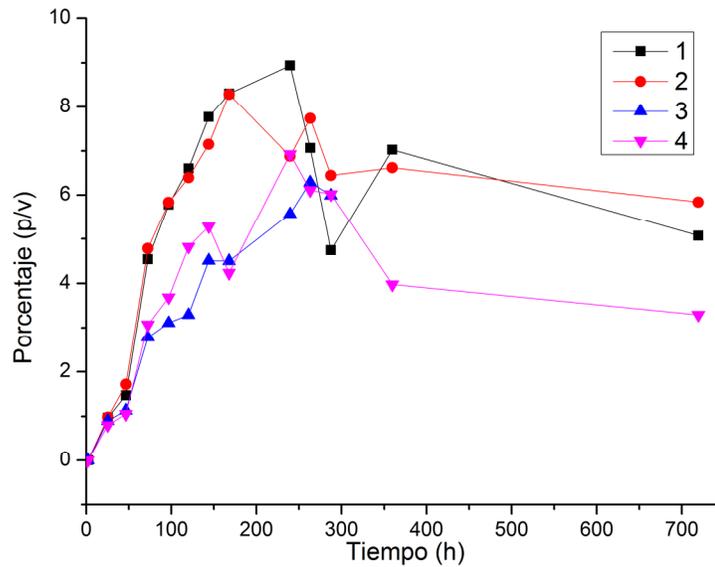


Figura 4-17. Producción de etanol para fermentación con adición de especias e insumos colombianos con HPLC

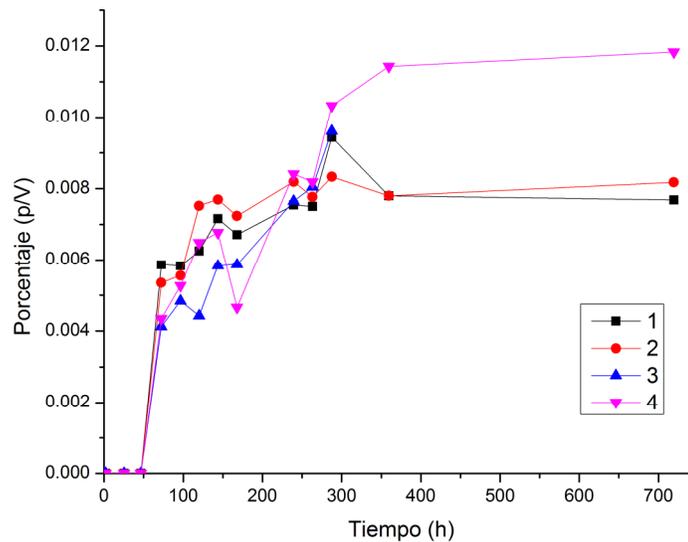


Figura 4-18. Producción de glicerol para fermentación con adición de especias e insumos colombianos con HPLC

Al realizar el análisis de componentes principales para estas fermentaciones, teniendo en cuenta todas las variables fisicoquímicas determinadas, incluyendo las señales obtenidas con los sensores de cobre y platino, se obtienen los resultados que se presentan en la figura 4-19, en los que se explica el 85.46% de la varianza total. La nomenclatura utilizada

para cada uno de los ensayos es la que se presenta en la tabla 4-5; la indicación t1, t2, etc., representa cada uno de los instantes de tiempo en los cuales fueron evaluadas dichas muestras. Se puede observar que los resultados obtenidos varían a lo largo del tiempo de fermentación y se relacionan con todas las variables determinadas.

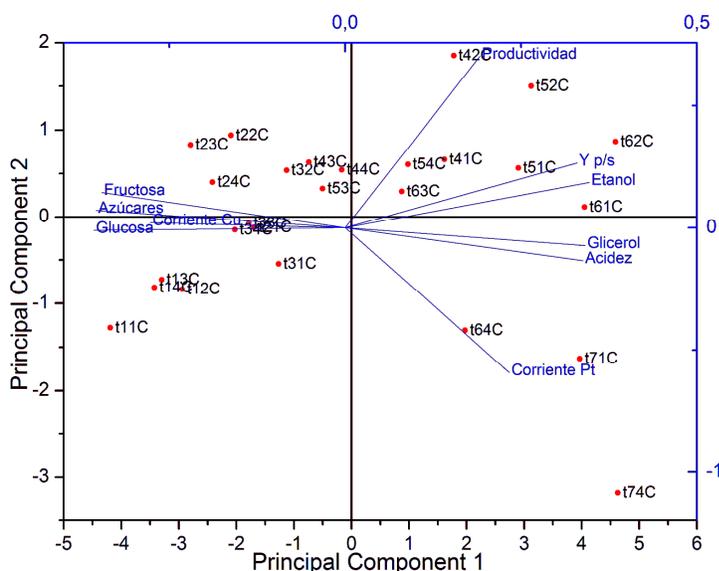


Figura 4-19. Análisis de componentes principales para las fermentaciones con especias e insumos colombianos

Sin embargo, observando la matriz de correlación obtenida presentada en la tabla 4-6, se puede establecer que el consumo total de azúcares, así como el de sacarosa, glucosa y fructosa se relacionan con la señal obtenida mediante el sensor de cobre. En el caso de la señal obtenida mediante el sensor de platino, ésta se relaciona con el incremento de la acidez, la producción de etanol y glicerol, así como el rendimiento. Sin embargo, estos valores de correlación son bastante inferiores a 1, lo cual permite afirmar que los modelos encontrados para este grupo de fermentaciones tendrán un coeficiente de correlación bajo.

Tabla 4-6. Matriz de Correlación para fermentaciones con especias e insumos colombianos

Variable	ΔI sensor Cu (μA)	ΔI sensor Pt (μA)
Azúcares	0,6360	-0,6035
Glucosa	0,6277	-0,5653
Fructosa	0,6339	-0,6285
Etanol	-0,6970	0,4730
Glicerol	-0,6036	0,6000

Continuación Tabla 4-6 Matriz de Correlación para fermentaciones con especias e insumos colombianos

Acidez	-0,6751	0,6280
Y p/s	-0,5868	0,3358
Productividad	-0,4768	0,0031
Corriente Cu	1,0000	-0,6032
Corriente Pt	-0,6032	1,0000

Teniendo en cuenta el comportamiento observado en la matriz de correlación, se hicieron dos regresiones lineales multivariadas para este grupo de fermentaciones.

En el caso de la señal obtenida con el electrodo de cobre, se presentan a continuación los parámetros obtenidos en las tablas 4-7 y 4-8. Dicho modelo posee un coeficiente de regresión cercano a 0.5, lo cual permite afirmar que la relación entre la señal determinada con el sensor de cobre y las variables relacionadas con el contenido de carbohidratos a lo largo del tiempo es baja.

Tabla 4-7. Parámetros del modelo lineal múltiple para la señal con electrodo de cobre y fermentaciones con especias e insumos colombianos

Variable	Valor	Error estándar
Intercepto	6.0474	12.9896
Azúcares totales	-1.37E+15	1.99E+15
Sacarosa	1.37E+15	1.99E+15
Glucosa	1.37E+15	1.99E+15
Fructosa	6.0474	12.9896

Tabla 4-8. Variables estadísticas para modelo lineal múltiple para la señal con electrodo de cobre y fermentaciones con especias e insumos colombianos

Variable	Valor
Residual de la suma de cuadrados	12084.2333
R Cuadrado ajustado	0.5256
Root-MSE (SD)	22.4390

En el caso de la señal obtenida para el electrodo de platino, se presentan en las tablas 4-9 y 4-10 los parámetros estadísticos obtenidos para el modelo lineal múltiple. Se observa que el valor del coeficiente de correlación es ligeramente superior a 0.4, lo cual permite afirmar que para este grupo de fermentaciones, la relación de la señal obtenida mediante el electrodo de platino se relaciona de manera baja con la acidez, el contenido de etanol y glicerol y el rendimiento a lo largo del tiempo de fermentación.

Tabla 4-9. Parámetros del modelo lineal múltiple para la señal con electrodo de platino y fermentaciones con especias e insumos colombianos

Variable	Valor	Error estándar
Intercepto	-0.5503	0.4626
Etanol	0.5348	0.3316
Glicerol	532.4678	174.0192
Acidez	0.0306	0.1477
Y p/s	-18.5861	6.9409

Tabla 4-10. Variables estadísticas para modelo lineal múltiple para la señal con electrodo de platino y fermentaciones con especias e insumos colombianos

Variable	Valor
Residual de la suma de cuadrados	50.9824
R Cuadrado ajustado	0.4468
Root-MSE (SD)	1.4888

4.2.2 Fermentaciones con insumos italianos

Se llevaron a cabo fermentaciones en Italia y en Bogotá, utilizando los mismos mostos presentados en la tabla 4-5.

- **Ensayos realizados en Italia**

En las figuras 4-20 a 4-24 se presentan los resultados obtenidos para las diferentes variables monitoreadas en las cuatro fermentaciones realizadas. Se evaluó la acidez total, la absorbancia a 267 nm, la cual tiene relación con la presencia de diferentes ácidos orgánicos, los azúcares totales, etanol y glicerol a lo largo del tiempo. Se evidencia que el

comportamiento para cada una de las fermentaciones realizadas fue diferente, debido a que las especias adicionadas no sólo afectan las características sensoriales sino el comportamiento de la levadura.

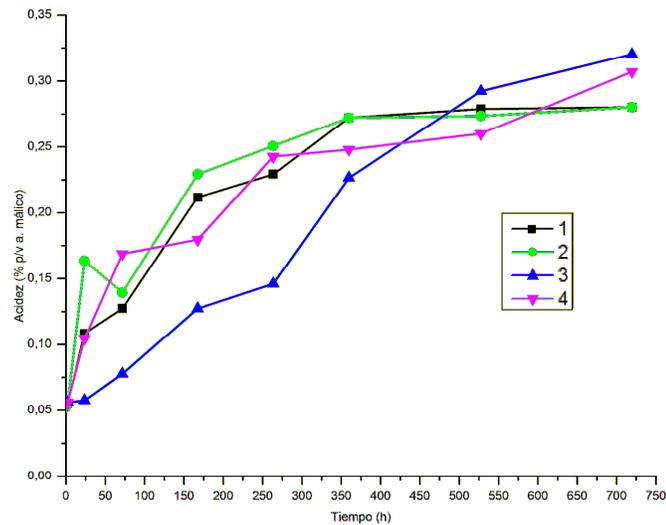


Figura 4-20. Monitoreo de acidez de fermentaciones utilizando diferentes especias

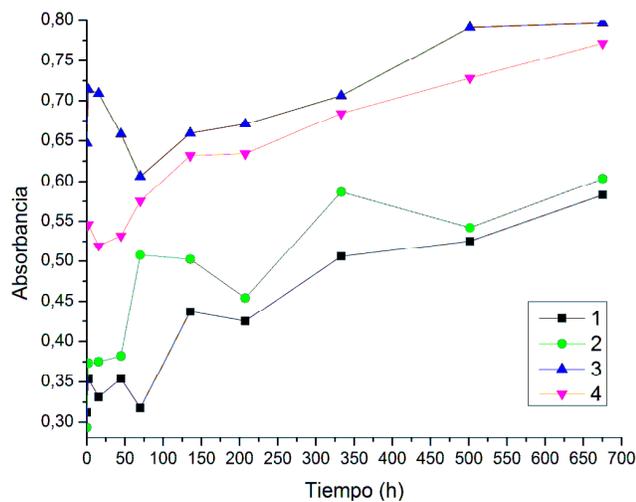


Figura 4-21. Monitoreo de absorbancia a 267 nm de fermentaciones utilizando diferentes especias

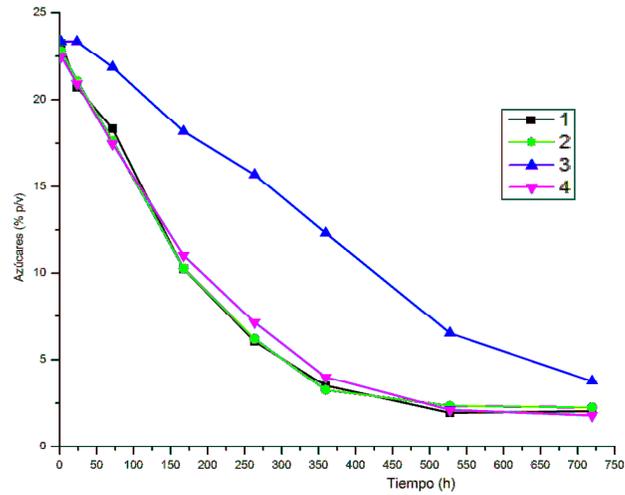


Figura 4-22. Monitoreo azúcares totales para fermentaciones utilizando diferentes especies con HPLC

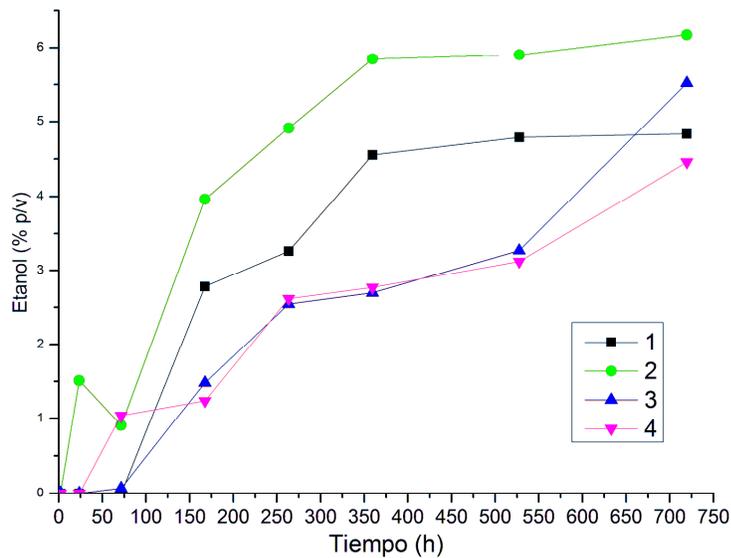


Figura 4-23. Monitoreo de etanol para fermentaciones utilizando diferentes especies con HPLC

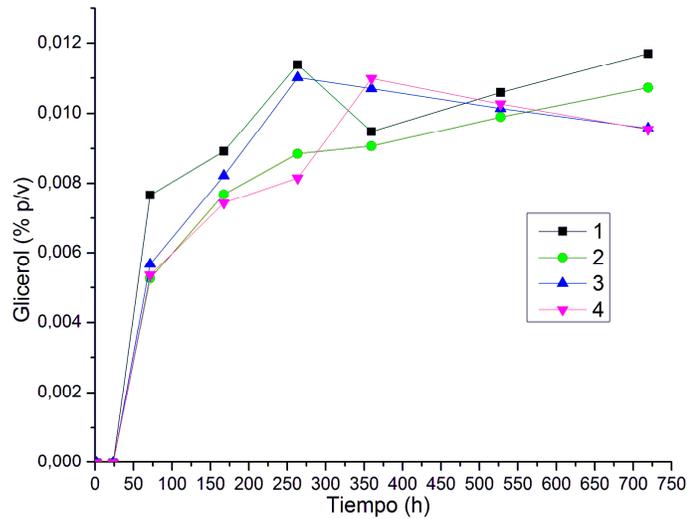


Figura 4-24. Monitoreo de glicerol para fermentaciones utilizando diferentes especies con HPLC

Adicionalmente, se llevó a cabo el monitoreo de la fermentación utilizando FTIR-ATR y se evidenció el cambio de cada uno de los espectros obtenidos a lo largo del tiempo; en las figuras 4-25 y 4-26 se presenta el comportamiento para los mostos y los hidromieles de cada una de las cuatro fermentaciones evaluadas. Estos espectros muestran la presencia de diferentes grupos funcionales, los cuales se relacionan con la composición de los mostos, como se observó en la figura 4-25. Además, van cambiando a lo largo del tiempo como se evidencia en la figura 4-26 debido a las transformaciones que sufre el mosto por acción de la levadura. Realizando un análisis Kruskal-Wallis con 95% de confiabilidad, se confirmó que las cuatro fermentaciones presentan comportamiento diferente.

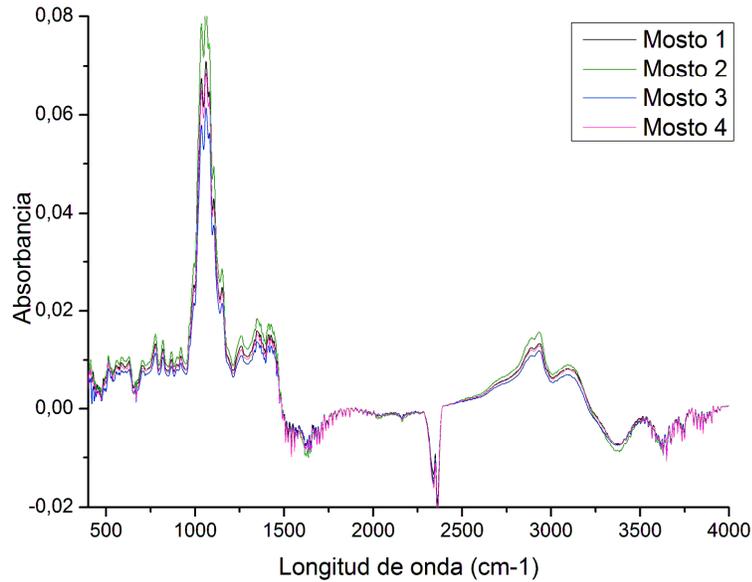


Figura 4-25. Comportamiento para mostos de fermentaciones utilizando diferentes especias con FTIR-ATR

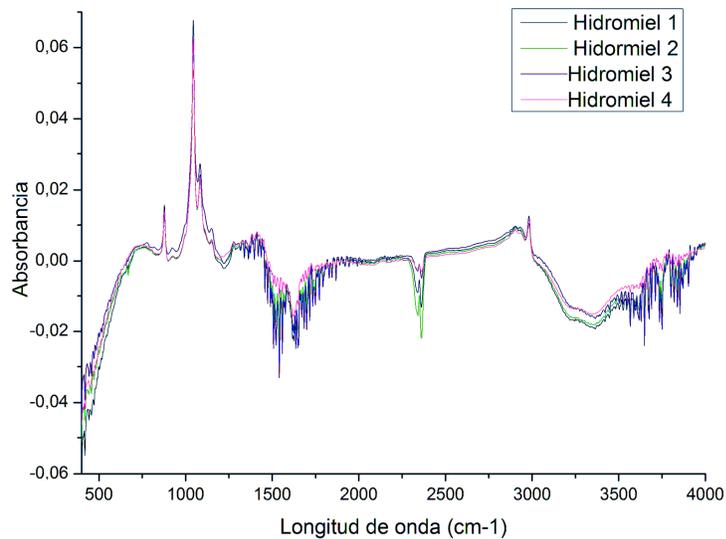


Figura 4-26. Comportamiento para hidromieles de fermentaciones utilizando diferentes especias con FTIR-ATR

Adicionalmente, se realizó un análisis estadístico de mínimos cuadrados parciales (PLS) con el fin de encontrar la correlación que existía entre los espectros FTIR-ATR obtenidos a lo largo del tiempo con las demás variables determinadas, también teniendo en cuenta los resultados obtenidos con el PTR-MS. En la tabla 4-11 se presentan los parámetros

encontrados en el análisis. Se evidencia la alta correlación con variables tales como Brix, concentración de glucosa, fructosa, azúcares totales, acidez total y absorbancia, teniendo en cuenta los valores para el coeficiente de correlación. Sin embargo, para el caso de los datos obtenidos con el PTR-MS las correlaciones son bajas, probablemente porque en el caso del FTIR, se determinan las muestras líquidas, mientras que en el PTR-MS se determinan las sustancias presentes en el espacio de cabeza disponible.

Tabla 4-11. Parámetros para análisis PLS de las variables determinadas y los espectros FTIR-ATR para fermentaciones utilizando diferentes especias

Variable	R ²	Error cuadrático medio de validación cruzada	Límite de detección
pH	0,6286	0,154	0,72
Brix	0,9663	1,01	0,7
Acidez	0,8502	0,387	0,74
Absorbancia	-0,07257	0,112	0,15
Azúcares	0,9597	1,61	0,71
Glucosa	0,9283	1,07	0,53
Fructosa	0,9701	0,705	0,7
Etanol	0,6656	1,19	0,15
Glicerol	0,581	0,00295	0,37
m/z 20	0,3475	235	0,7
m/z 21	0,02254	873	0,15
m/z 26	0,548	511	0,7
m/z 27	0,4658	1,12E+05	0,46
m/z 28	0,4691	2,61E+03	0,46
m/z 30	0,162	538	0,15
m/z 31	0,596	3,90E+03	0,69
m/z 33	0,03091	339	0,15
m/z 37	-0,00632	8,73E+03	0,15
m/z 38	0,01418	20,1	0,15
m/z 39	0,2203	3,87E+03	0,15
m/z 41	0,1957	9,67E+03	0,15
m/z 43	0,1909	1,13E+04	0,15
m/z 44	0,1829	332	0,15
m/z 45	0,01516	1,39E+05	0,16
m/z 46	0,01868	3,46E+03	0,16
m/z 48	0,2593	1,21E+04	0,15
m/z 49	0,2578	1,17E+03	0,15
m/z 53	0,236	230	0,15
m/z 55	0,2253	857	0,15
m/z 57	0,1792	2,28E+03	0,15
m/z 59	0,007597	388	0,15
m/z 61	0,2942	1,81E+04	0,15
m/z 62	0,3001	445	0,15

Continuación Tabla 4-11 Parámetros para análisis PLS de las variables determinadas y los espectros FTIR-ATR para fermentaciones utilizando diferentes especies

Variable	R ²	Error cuadrático medio de validación cruzada	Límite de detección
m/z 63	0,1159	256	0,15
m/z 71	0,121	2,26E+03	0,15
m/z 73	0,115	2,33E+03	0,15
m/z 84	0,3946	74,2	0,65
m/z 89	0,2012	1,22E+03	0,15
m/z 105	-0,0854	578	0,14
m/z 117	0,3662	196	0,15

Se llevó a cabo el monitoreo de la fermentación utilizando PTR-MS, técnica que permite tener una “huella” del olor que presentan cada una de las muestras a lo largo del tiempo, la cual permitió evidenciar las diferencias tanto en cada uno de los mostos iniciales, como en los vinos finales; en las figuras 4-27 y 4-28 se presenta el comportamiento para los mostos y los hidromieles de cada una de las cuatro fermentaciones evaluadas. Realizando un análisis Kruskal-Wallis con 95% de confiabilidad, se confirmó que las cuatro fermentaciones presentan comportamiento diferente. Las variaciones de las señales obtenidas mediante este análisis permiten confirmar que existen cambios en los perfiles aromáticos a lo largo del tiempo de fermentación, y adicionalmente dichos perfiles tienen relación con la composición inicial de los mostos de partida, los cuales son diferentes entre sí para las cuatro fermentaciones evaluadas.

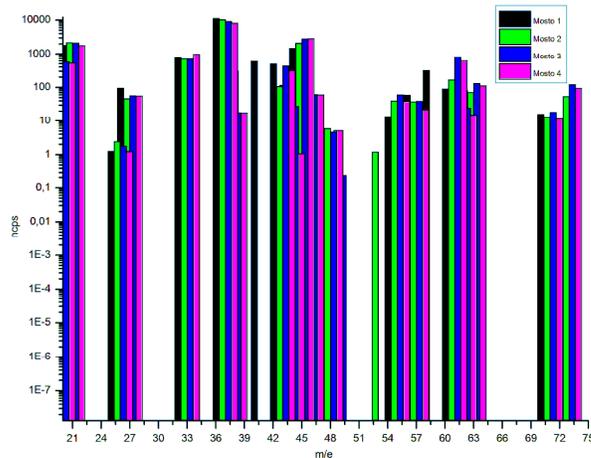


Figura 4-27. Comportamiento para mostos de fermentaciones utilizando diferentes especies con PTR-MS

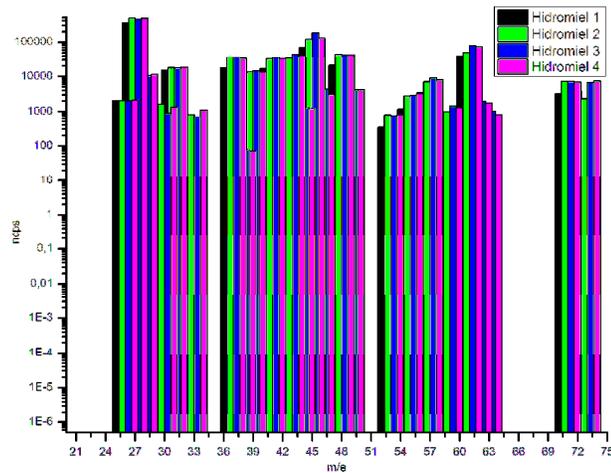


Figura 4-28. Comportamiento para hidromieles de fermentaciones utilizando diferentes especies con PTR-MS

A través de un análisis de componentes principales para los diferentes datos obtenidos con esta técnica, el cual explica el 85.27% de la varianza total de los datos, el cual se presenta en la figura 4-29, se confirman las observaciones realizadas previamente. A lo largo del tiempo, las diferentes masas determinadas cambian y tienen mayor o menor relación dependiendo del mosto de partida y el instante de tiempo en el cual fue realizada la medición, por lo cual se evidencia el uso de este tipo de técnica como herramienta para el monitoreo a lo largo del tiempo del proceso fermentativo.

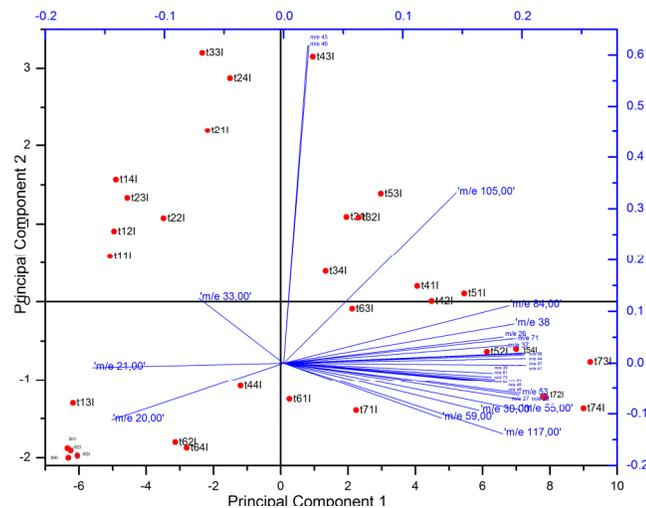


Figura 4-29. Análisis de componentes principales para determinaciones con PTR-MS

▪ Ensayos realizados en Colombia

Estos ensayos se llevaron a cabo en Colombia, utilizando los mismos insumos anteriores, excepto el agua, la cual provenía del acueducto de Bogotá. En las figuras 4-30 y 4-31 se observan los resultados obtenidos para la fermentación llevada a cabo. Similarmente a lo realizado con realizando en el numeral 4.2.1, con un análisis de Kruskal-Wallis con 95%, se encuentra que todas las fermentaciones presentaron un comportamiento distinto a lo largo del tiempo. Con ambos tipos de señales, se evidencia una diferencia significativa para cada una de las fermentaciones realizadas, lo cual confirma que la composición del mosto de partida influencia el proceso fermentativo debido no sólo por el contenido de diferentes insumos sino posiblemente al cambio en el metabolismo de la levadura debido a la presencia de diferentes sustancias.

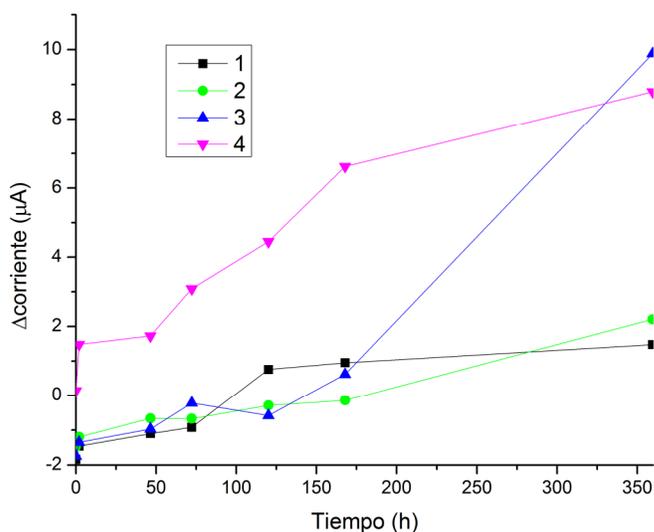


Figura 4-30. Monitoreo de fermentación con adición de especias e insumos italianos con electrodo de platino (AC1W2R1) y ácido perclórico y cloruro de potasio como búfer

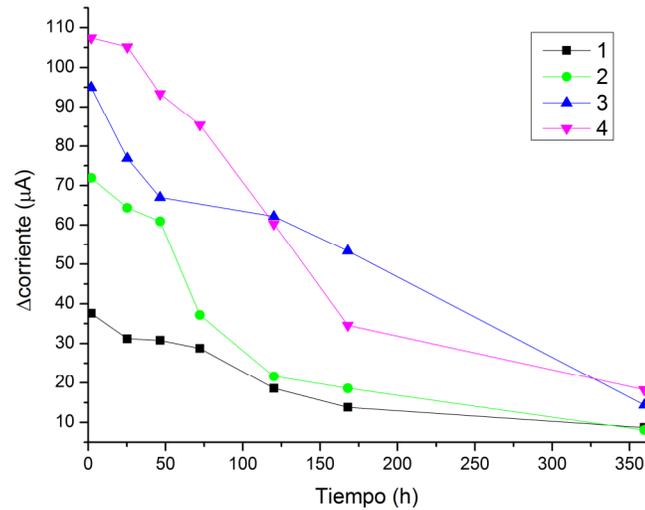


Figura 4-31. Monitoreo fermentación con adición de especias e insumos italianos con electrodo de grafito (AC1W4R2) modificado con cobre y NaOH 0.1 M como búfer

En las figuras 4-32 a 4-35 se presenta el comportamiento para la acidez total, los azúcares totales, etanol y glicerol para las fermentaciones realizadas con insumos italianos. Es importante tener en cuenta que al realizar análisis ANOVA con 95% de confiabilidad se confirmó que el comportamiento de cada una de las fermentaciones es diferente, así como se observó en las figuras 4-30 y 4-31.

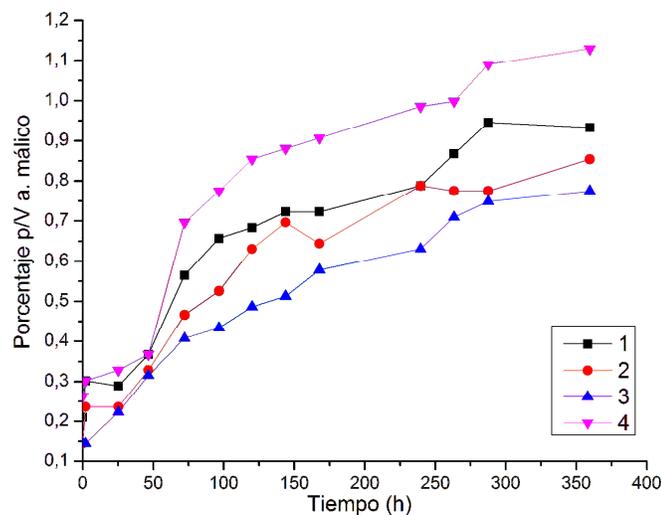


Figura 4-32. Acidez total para fermentación con adición de especias e insumos italianos

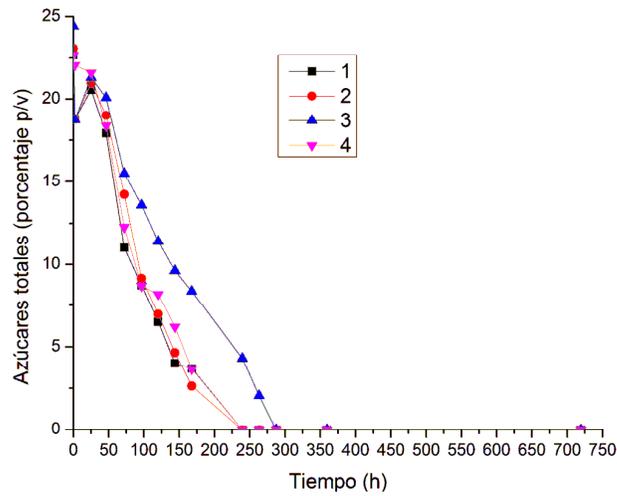


Figura 4-33. Consumo de azúcares totales para fermentación con adición de especias e insumos italianos con HPLC

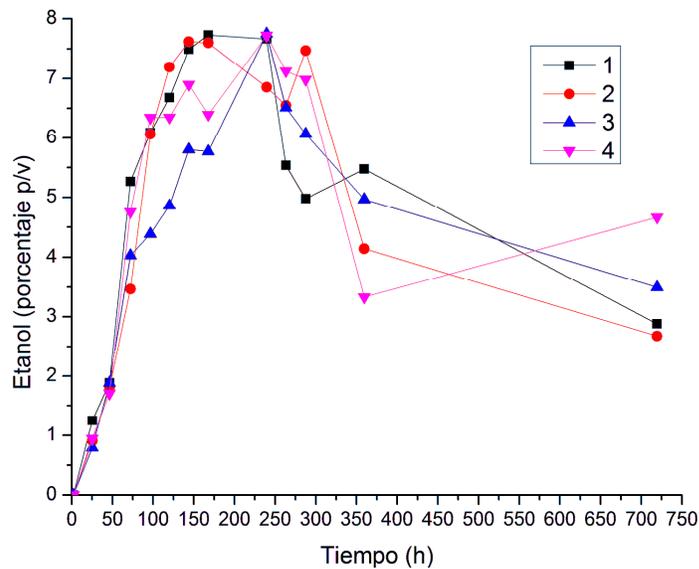


Figura 4-34. Producción de etanol para fermentación con adición de especias e insumos italianos con HPLC

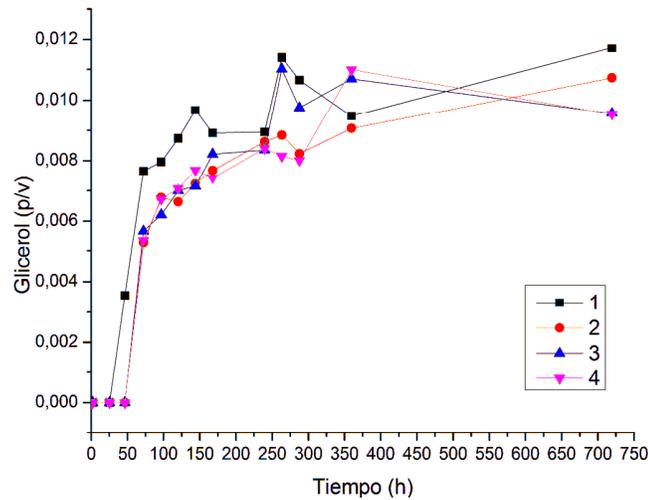


Figura 4-35. Producción de glicerol para fermentación con adición de especias e insumos italianos con HPLC

Después de observar los resultados obtenidos en los numerales 4.2.1 y 4.2.2, se evidencia que a pesar que las fermentaciones partieron de mostos con composiciones similares, el origen de los insumos (miel, polen y agua) afectó notablemente el comportamiento de la levadura a lo largo de la fermentación, observándose diferencias en los perfiles obtenidos tanto con las determinaciones electroquímicas, como con las determinaciones tradicionales; estos resultados se pudieron confirmar con la realización de las determinaciones con FTIR-ATR y PTR-MS, que a pesar de generar señales diferentes, mostraron que a lo largo del tiempo la fermentación se ve afectada por la composición inicial del mosto. Sin embargo, las tendencias de las señales obtenidas para el sensor de platino siempre son crecientes en el tiempo, mientras que en el caso del sensor modificado con cobre son decrecientes.

Al realizar el análisis de componentes principales para estas fermentaciones, teniendo en cuenta todas las variables fisicoquímicas determinadas, incluyendo las señales obtenidas con los sensores de cobre y platino, se obtienen los resultados que se presentan en la figura 4-36, en los que se explica el 88.05% de la varianza total; se puede observar que la relación entre los resultados obtenidos se da con respecto al tiempo de fermentación (t1 a t7 representa cada uno de los siete instantes de tiempo en los cuales fueron tomadas las diferentes muestras de cada una de las fermentaciones realizadas 1,2,3,4).

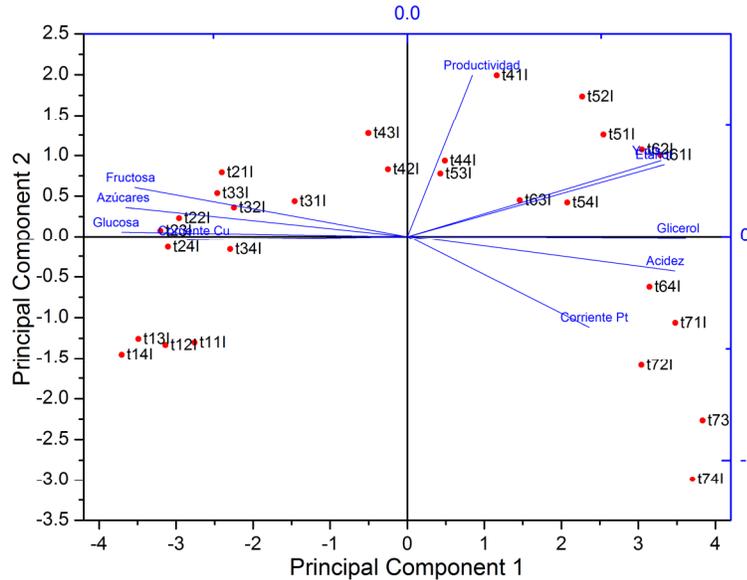


Figura 4-36. Análisis de componentes principales para las fermentaciones con especias e insumos colombianos

Adicionalmente, la matriz de correlación obtenida presentada en la tabla 4-12, permite establecer que el consumo total de azúcares, así como el de sacarosa, glucosa y fructosa se relaciona con la señal obtenida mediante el sensor de cobre. En el caso de la señal obtenida mediante el sensor de platino, ésta se relaciona fuertemente con el incremento de la acidez, la producción de etanol y glicerol, así como con el rendimiento.

Tabla 4-12. Matriz de Correlación para fermentaciones con especias e insumos colombianos

Variable	ΔI sensor Cu (μA)	ΔI sensor Pt (μA)
Azúcares	0.7563	-0.6482
Glucosa	0.7416	-0.6089
Fructosa	0.7537	-0.6682
Etanol	-0.6148	0.3770
Glicerol	-0.7221	0.6026
Acidez	-0.6401	0.7630
Y p/s	-0.6412	0.3177
Productividad	-0.1229	-0.1174
Corriente Cu	1.0000	-0.2757
Corriente Pt	-0.27573	1.0000

Teniendo en cuenta el comportamiento observado en la matriz de correlación, se hicieron dos regresiones lineales multivariadas para este grupo de fermentaciones.

En el caso de la señal obtenida con el electrodo de cobre, se presentan a continuación los parámetros obtenidos en las tablas 4-13 y 4-14. Dicho modelo posee un coeficiente de regresión de 0.57, lo cual permite afirmar que la relación de la señal determinada con el sensor de cobre y las variables relacionadas con el contenido de carbohidratos a lo largo del tiempo es baja.

Tabla 4-13. Parámetros del modelo lineal múltiple para la señal con electrodo de cobre y fermentaciones con especias e insumos italianos

Variable	Valor	Error estándar
Intercepto	18.1423	9.4783
Azúcares totales	-9.39E+14	5.81E+14
Glucosa	9.39E+14	5.81E+14
Fructosa	9.39E+14	5.81E+14

Tabla 4-14. Variables estadísticas para modelo lineal múltiple para la señal con electrodo de cobre y fermentaciones con especias e insumos italianos

Variable	Valor
Residual de la suma de cuadrados	9758.3172
R Cuadrado ajustado	0.5668
Root-MSE (SD)	20.1642

En el caso de la señal obtenida para el electrodo de platino, se presentan en las tablas 4-15 y 4-16 los parámetros estadísticos obtenidos para el modelo lineal múltiple. Se observa que el valor del coeficiente de correlación es superior a 0.6, lo cual permite afirmar que para este grupo de fermentaciones, la relación de la señal obtenida mediante el electrodo de platino se relaciona de manera media con la acidez, el contenido de etanol y glicerol y el rendimiento a lo largo de la fermentación.

Tabla 4-15. Parámetros del modelo lineal múltiple para la señal con electrodo de platino y fermentaciones con especias e insumos italianos

Variable	Valor	Error estándar
Intercepto	-2.0410	1.2462
Etanol	3.4687	1.7269
Glicerol	452.1441	298.0265
Acidez	5.4777	4.2293
Y p/s	-78.1833	33.4564

Tabla 4-16. Variables estadísticas para modelo lineal múltiple para la señal con electrodo de platino y fermentaciones con especias e insumos italianos

Variable	Valor
Residual de la suma de cuadrados	68.1125
R Cuadrado ajustado	0.6843
Root-MSE (SD)	1.7209

Al combinar todos los datos obtenidos con los insumos colombianos e italianos y realizar un análisis de componentes principales, se presenta un comportamiento similar al observado en las figuras 4-35 y 4-36, como se observa en la figura 4-37, en la cual se explica el 80,18% de la varianza total de los datos. A lo largo del tiempo, cada uno de los mostos tiene una evolución similar, pasando del cuadrante izquierdo al cuadrante derecho, lo cual evidencia la importancia de todas las determinaciones realizadas para el seguimiento del proceso, como se evidenció mediante el análisis de componentes principales presentado en la figura 4-37.

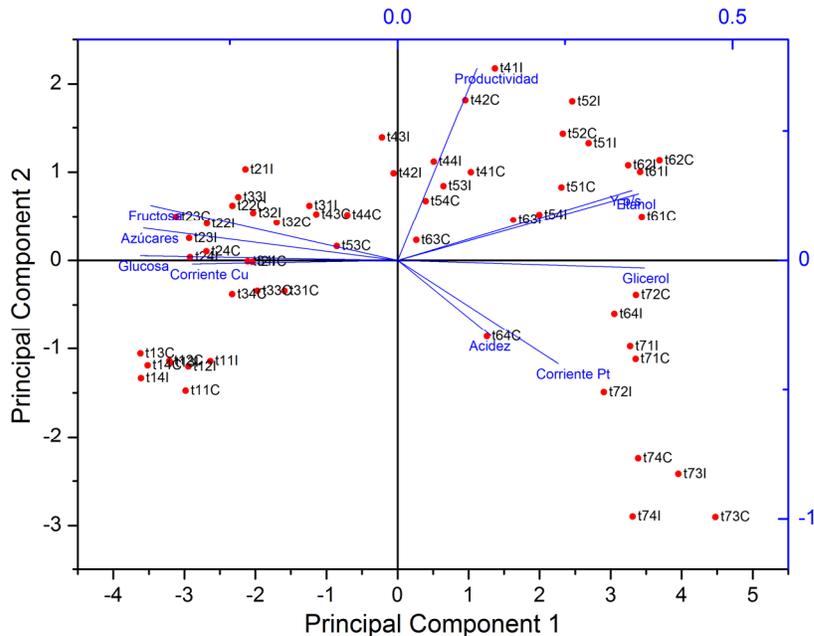


Figura 4-37. Análisis de componentes principales para todas las fermentaciones realizadas con especias con insumos colombianos e italianos

Adicionalmente, la matriz de correlación presentada en la tabla 4-17 evidencia nuevamente las relaciones que tienen cada una de las variables determinadas con las señales de los electrodos de cobre y platino.

Tabla 4-17. Matriz de Correlación para fermentaciones con especias e insumos colombianos e italianos

Variable	ΔI sensor Cu (μA)	ΔI sensor Pt (μA)
Azúcares	0.7540	-0.6464
Glucosa	0.7386	-0.6112
Fructosa	0.7524	-0.6638
Etanol	-0.6752	0.4140
Glicerol	-0.6846	0.6038
Acidez	-0.2553	0.1770
Y p/s	-0.6407	0.3401
Productividad	-0.2430	-0.0725
Corriente Cu	1.0000	-0.4027
Corriente Pt	-0.4027	1.0000

Adicionalmente, al realizar los modelos lineales multivariados para las señales obtenidas con los sensores de cobre y platino, se observan tendencias similares a aquellas

observadas para cada una de las fermentaciones separadas, ya que los coeficientes de correlación son menores a 0.9. En las tablas 4-18 a 4-21 se presentan los resultados obtenidos para cada uno de los sensores.

Tabla 4-18. Parámetros del modelo lineal múltiple para la señal con electrodo de cobre y fermentaciones con especias e insumos colombianos e italianos

Variable	Valor	Error estándar
Intercepto	34.2094	12.5844
Azúcares	5.06E+15	2.47E+15
Glucosa	-5.06E+15	2.47E+15
Fructosa	-5.06E+15	2.47E+15

Tabla 4-19. Variables estadísticas para modelo lineal múltiple para la señal con electrodo de cobre y fermentaciones con especias e insumos colombianos e italianos

Variable	Valor
Residual de la suma de cuadrados	21508.4267
R Cuadrado ajustado	0.5789
Root-MSE (SD)	20.3377

Tabla 4-20. Parámetros del modelo lineal múltiple para la señal con electrodo de platino y fermentaciones con especias e insumos colombianos e italianos

Variable	Valor	Error estándar
Intercepto	-0.4836	0.4200
Etanol	0.6496	0.3563
Glicerol	729.0971	132.4907
Acidez	-0.0014	0.1726
Y p/s	-24.5126	7.2308

Tabla 4-21. Variables estadísticas para modelo lineal múltiple para la señal con electrodo de platino y fermentaciones con especias e insumos colombianos e italianos

Variable	Valor
Residual de la suma de cuadrados	177.6485
R Cuadrado ajustado	0.4757
Root-MSE (SD)	1.8664

4.2.3 Defectos en las fermentaciones con adición de especias e insumos italianos

Se llevaron a cabo diferentes ensayos con insumos italianos, de acuerdo con lo descrito en el numeral 4.2.2. Sin embargo, a lo largo del tiempo, dichas fermentaciones presentaron una contaminación, probablemente por una bacteria acética, la cual hizo que el curso de la fermentación no fuera el mismo.

Teniendo en cuenta los resultados previamente obtenidos en las figuras 4-13, 4-14, 4-30 y 4-31, en las figuras 4-38 y 4-39 se evidencian notables diferencias con los perfiles obtenidos para todas las fermentaciones con los mismos sensores utilizados. A través de un análisis de Kruskal-Wallis con 95% de significancia, se encuentra que todas las fermentaciones presentaron un comportamiento diferente a lo largo del tiempo; además, se evidencia que las señales no presentan los comportamientos esperados (figuras 4-30 y 4-31); estos resultados pueden deberse no sólo a la composición de cada uno de los mostos sino también a la presencia de un agente biológico externo contaminante; por lo tanto, las señales obtenidas presentan diferencias significativamente diferentes para una fermentación que está siguiendo el curso adecuado y una que ha sido probablemente contaminada con una bacteria acética presente en el ambiente.

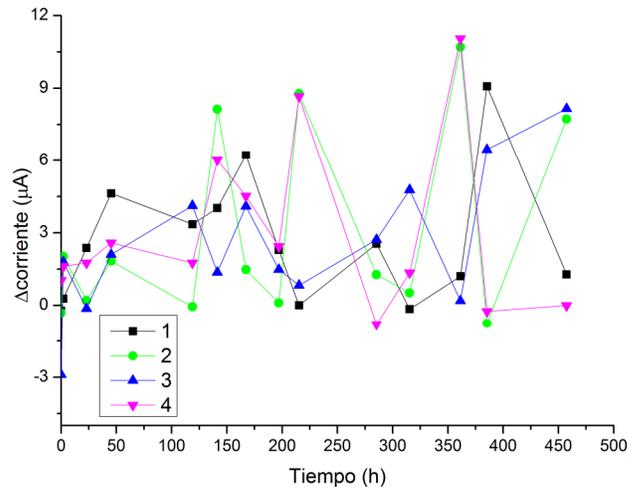


Figura 4-38. Monitoreo en fermentaciones contaminadas, con adición de especias e insumos italianos con electrodo con electrodo de platino (AC1W2R1) y ácido perclórico y cloruro de potasio como búfer

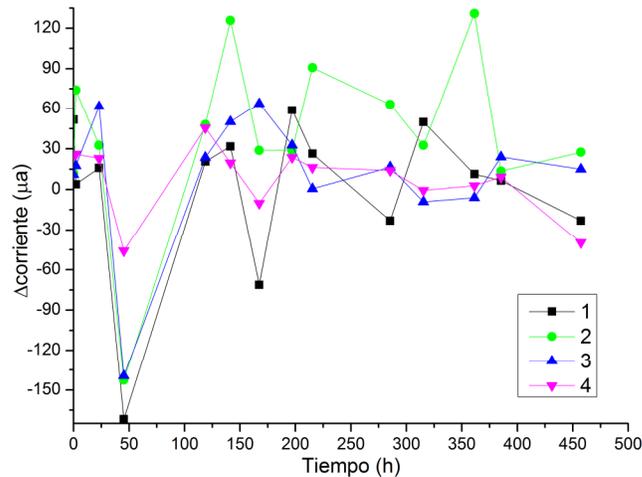


Figura 4-39. Monitoreo en fermentaciones contaminadas, con adición de especias e insumos italianos con electrodo de grafito (AC1W4R2) modificado con cobre y NaOH 0.1 M como búfer

En las figuras 4-40 a 4-42 se presenta el comportamiento para los azúcares totales, la acidez total y el etanol a lo largo del tiempo de las cuatro fermentaciones. El comportamiento de cada una de las fermentaciones es diferente, y adicionalmente, los resultados obtenidos en los numerales 4.2.1 y 4.2.2 son completamente diferentes. Además, no se presentó la generación de glicerol, lo cual evidencia la posible inhibición de

la levadura. Estos resultados obtenidos pueden estar relacionados con la presencia de un agente biológico externo que ha inhibido a la levadura, puesto que el consumo de azúcares y la producción de etanol se llevó a cabo de forma desordenada; adicionalmente, en la figura 4-40, en la cual se presenta el comportamiento para la acidez total, se observan valores muy altos para la acidez, si se comparan con los observados en la figura 4-32, permitiendo evidenciar la producción de mayor cantidad de ácido que en las demás fermentaciones anteriormente evaluadas.

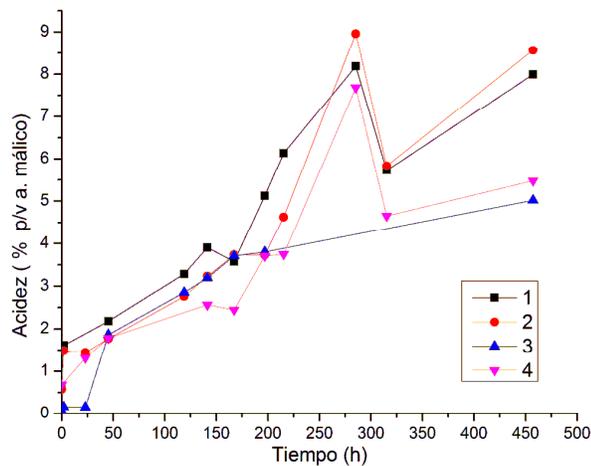


Figura 4-40. Acidez total en fermentaciones contaminadas, con adición de especias e insumos italianos

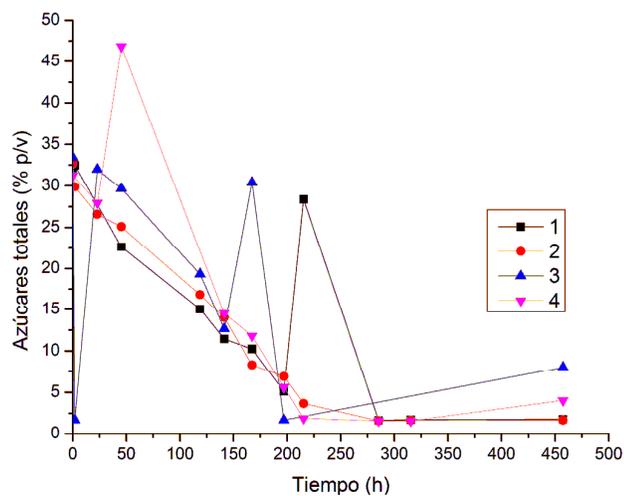


Figura 4-41. Monitoreo de azúcares totales en fermentaciones contaminadas, con adición de especias e insumos italianos utilizando HPLC

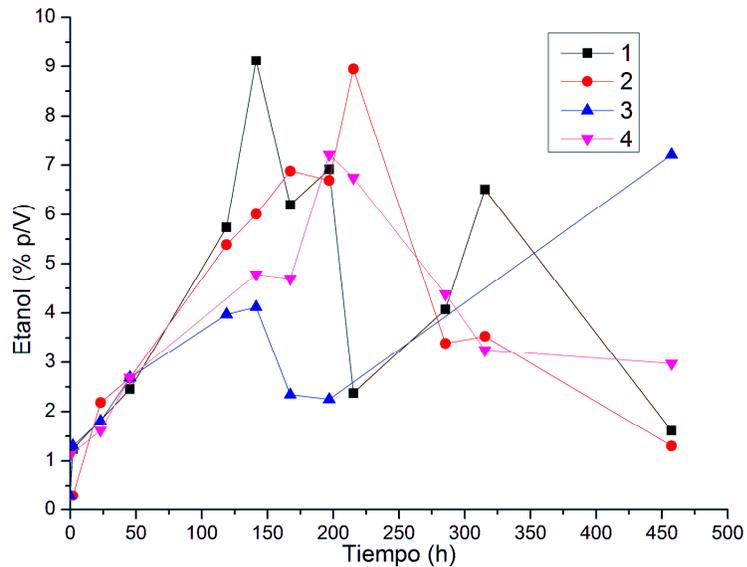


Figura 4-42. Monitoreo de etanol en fermentaciones contaminadas, con adición de especias e insumos italianos utilizando HPLC

Los resultados obtenidos en los numerales 4.2.1, 4.2.2 y 4.2.3 permitieron confirmar la posibilidad de la utilización del sistema de gusto artificial para el monitoreo de la fermentación alcohólica. A pesar de utilizarse los mismos modificadores sensoriales (clavo y ají), el cambio de insumos como el polen, miel y agua tienen una influencia importante en el comportamiento de la levadura, el cual se mostró diferente en cada una de las fermentaciones evaluadas. Adicionalmente, las determinaciones realizadas con el sistema de gusto artificial presentaron señales totalmente diferentes para el caso de la fermentación que presentó una posible contaminación, lo cual fue confirmado por los demás análisis realizados.

Al llevar a cabo un análisis de componentes principales, en el cual se explica el 67% de la varianza total de los datos, se observa un comportamiento irregular con el tipo de mosto empleado y con el tiempo de fermentación, como se presenta en la figura 4-43.

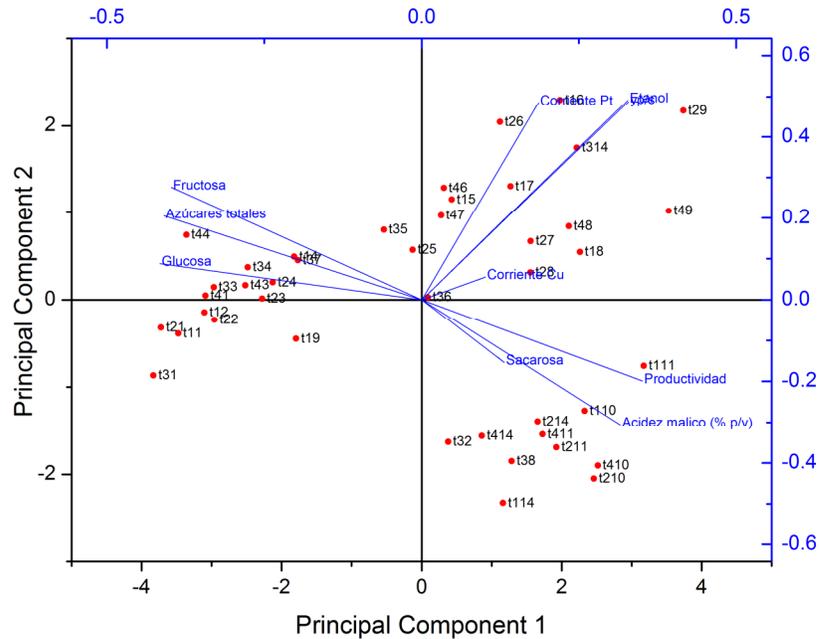


Figura 4-43. Análisis de componentes principales para fermentaciones con adición de especias, insumos italianos y contaminación

Adicionalmente, en la matriz de correlación, presentada en la tabla 4-22 muestra que hay muy baja correlación entre las variables determinadas y las señales de los sensores de cobre y platino.

Tabla 4-22. Matriz de correlación para fermentaciones con adición de especias, insumos italianos y contaminación

Variable	ΔI sensor Cu (μA)	ΔI sensor Pt (μA)
Azúcares totales	-0.1647	-0.2731
Sacarosa	0.0484	0.1189
Glucosa	-0.1625	-0.3460
Fructosa	-0.1631	-0.2211
Etanol	0.1862	0.4847
Acidez total	0.1017	0.1752
Y p/s	0.1785	0.4808
Productividad	0.1870	0.1520
Corriente Cu	1.0000	0.0337
Corriente Pt	0.0337	1.0000

4.3 Fermentaciones con adición de hierbas y especias

De acuerdo con lo mencionado en el numeral 2.1.6, se adicionaron diferentes sustancias para modificar las características sensoriales del hidromiel. Se utilizaron las materias primas explicadas en los numerales 2.1.1, 2.1.2, 2.1.3, 2.1.4 y 2.1.6, y se utilizaron las condiciones del numeral 2.2 para llevar a cabo la fermentación.

Inicialmente se realizaron pruebas sensoriales preliminares con el fin de definir las combinaciones de hierbas a utilizar; para ello se prepararon los mostos iniciales con todas las combinaciones posibles para las hierbas y se compararon con el hidromiel tradicional. Las combinaciones seleccionadas fueron yerbabuena con limonaria y yerbabuena con canela; las demás combinaciones probadas no presentaron aceptación por parte de los consumidores potenciales. Por lo tanto, en la tabla 4-23 se presentan los seis mostos utilizados para llevar a cabo las fermentaciones así como las concentraciones de las hierbas en los mostos, expresadas como gramos de hierba por litro de mosto.

Tabla 4-23. Composición de los mostos evaluados

Mostos iniciales	Nomenclatura	Concentración
Mosto sin adiciones (Patrón o Blanco)	B	-
Yerbabuena	Y	40 g/L
Limonaria	L	60 g/L
Canela	C	12,5 g/L
Yerbabuena –Canela	YC	28 g/L Y + 3.75 g/L C
Yerbabuena – Limonaria	YL	24 g/L Y + 24 g/L L

Para estos ensayos se empleó el potencióstato Palmsens con electrodos comerciales de platino (AC1W2R1) y la metodología descrita en la tabla 2-11. También se utilizaron sensores de grafito (AC1W4R1) modificados con cobre de acuerdo con el procedimiento descrito en el numeral 2.5.3, utilizando las condiciones de la tabla 2-14. El monitoreo se llevó a lo largo de 310 horas.

En las figuras 4-44 y 4-45 se presentan los resultados obtenidos para el sensor de grafito modificado con cobre y el sensor de platino (respectivamente). Realizando un análisis de Kruskal-Wallis con 95% de significancia, se encuentra que todas las fermentaciones presentaron un comportamiento diferente. Es importante tener en cuenta que las tendencias de las señales observadas son diferentes para cada uno de los sensores empleados, lo que

se debe al cambio en la composición del mosto a lo largo del tiempo de fermentación, debido al consumo de los carbohidratos presentes en la miel y a la producción de otras sustancias como ácidos y alcoholes, que hacen que las características electroquímicas de las muestras analizadas sean distintas, y por lo tanto las señales encontradas sean diferentes. Las hierbas utilizadas en estas fermentaciones generalmente contienen sustancias terpenoides que afectan las características sensoriales de las bebidas obtenidas (Campbell-Platt 2009); adicionalmente, los extractos de origen vegetal contienen vitaminas, sustancias antioxidantes y antimicrobianas que pueden afectar el metabolismo de la levadura, incrementando o disminuyendo las velocidades de producción de etanol, consumo de azúcares y producción de ácidos (Dezmirean et al. 2012).

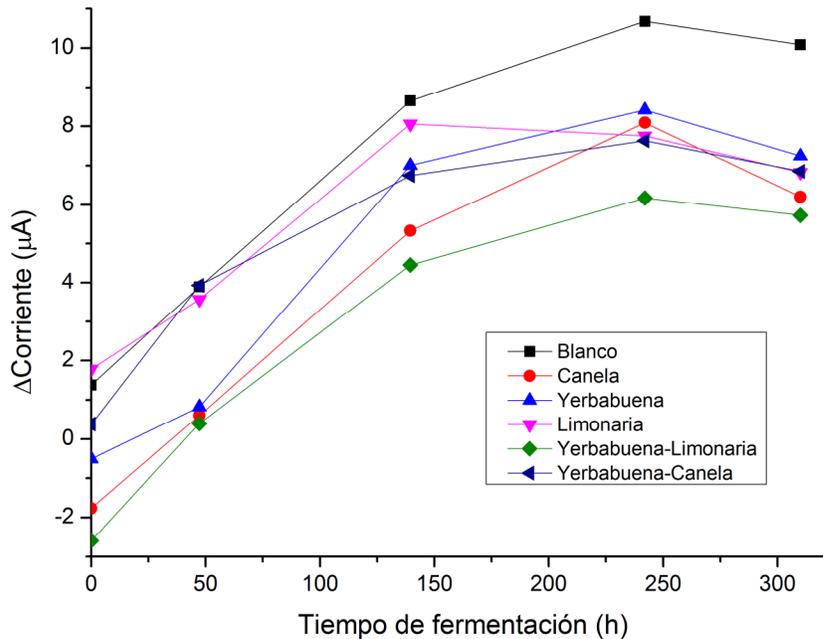


Figura 4-44. Monitoreo de fermentación de hidromieles con hierbas con electrodo de platino (AC1W2R1) y ácido perclórico y cloruro de potasio como búfer

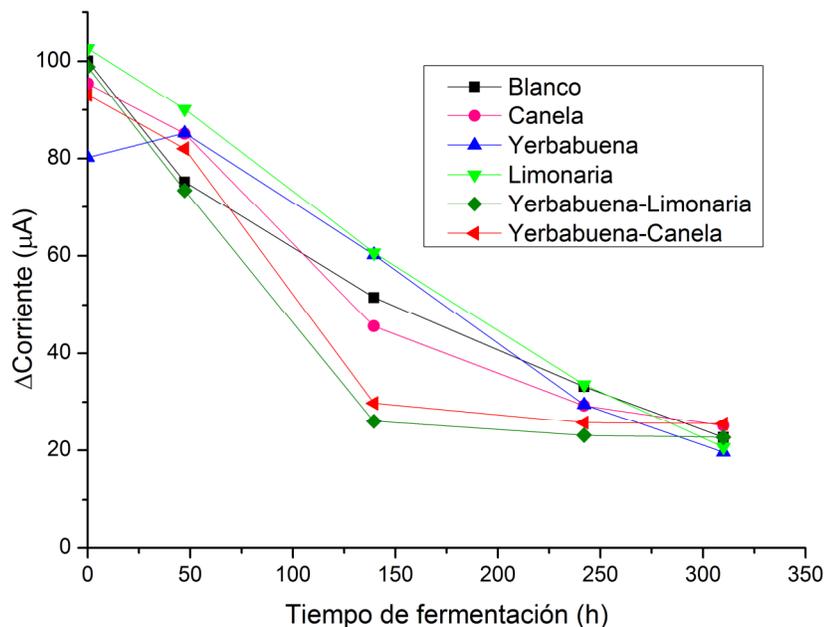


Figura 4-45. Monitoreo de fermentación de hidromieles con hierbas con electrodo de grafito (AC1W4R2) modificado con cobre y NaOH 0.1 M como búfer

En las figuras 4-46, 4-47 y 4-48 se presentan algunos de los resultados obtenidos para las fermentaciones evaluadas. Se puede observar el comportamiento para el consumo de azúcares totales, evaluado mediante HPLC, teniendo en cuenta la cantidad de sacarosa, glucosa y fructosa presentes en cada uno de los mostos y el cambio a lo largo del tiempo; adicionalmente se presentan los resultados para la producción de etanol y el perfil de acidez total. Al realizar análisis ANOVA con 95% de significancia, se observó que hay diferencias significativas entre todas las fermentaciones analizadas, lo cual confirma los resultados anteriormente observados en las figuras 4-44 y 4-45, pues el comportamiento de cada una de las fermentaciones es diferente debido precisamente al contenido de diferentes sustancias que afectan el comportamiento de la levadura a lo largo de la fermentación.

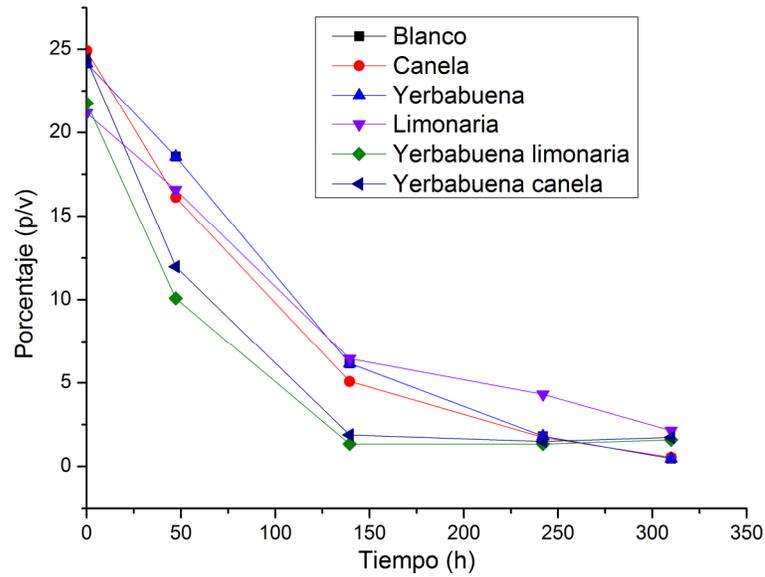


Figura 4-46. Monitoreo de azúcares totales utilizando HPLC para fermentación de hidromieles con hierbas

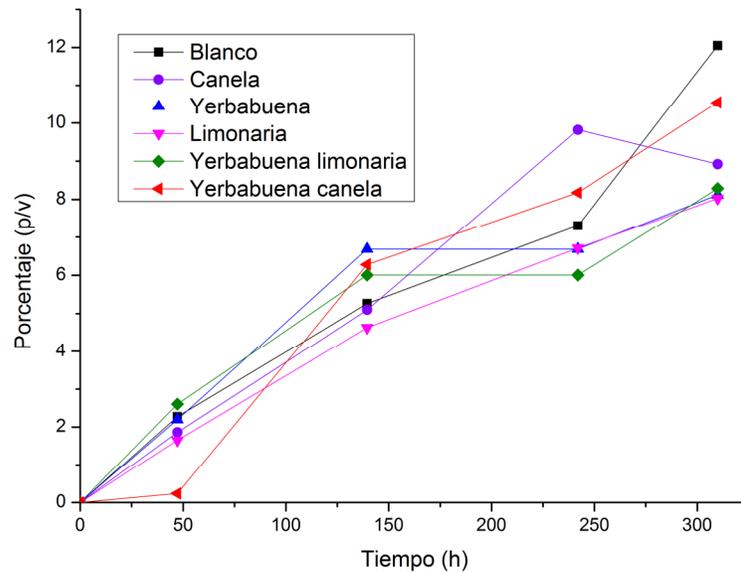


Figura 4-47. Monitoreo de producción de etanol (%p/v) utilizando HPLC para fermentación de hidromieles con hierbas

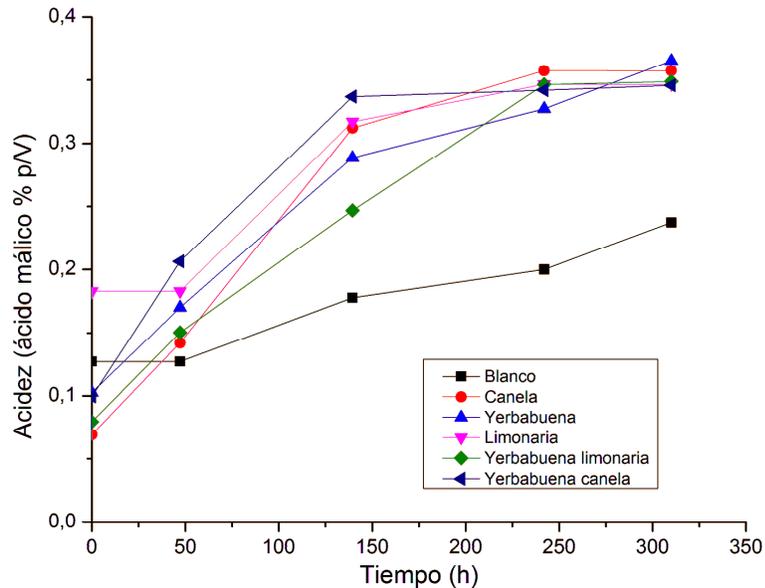


Figura 4-48. Monitoreo de acidez total para fermentación de hidromieles con hierbas

De acuerdo con las tendencias que se presentan en las figuras evaluadas anteriormente, se evidencia la relación que puede existir entre la cantidad de azúcares totales, glucosa y fructosa con la señal obtenida con el sensor de cobre, mientras que en el caso de la concentración de etanol, glicerol y rendimiento producto/sustrato tienen relación con las señales obtenidas utilizando el sensor de platino. Estos comportamientos se confirman al realizar el análisis de componentes principales para estas fermentaciones, teniendo en cuenta todas las variables fisicoquímicas determinadas, incluyendo las señales obtenidas con los sensores de cobre y platino, se obtienen los resultados que se presentan en la figura 4-49, en los que se explica el 87% de la varianza total. La nomenclatura de cada una de las muestras evaluada es la misma que se presenta en la tabla 4-23.

obtenidos en las tablas 4-25 y 4-26. Dicho modelo posee un coeficiente de regresión alto, superior a 0.9, lo que permite afirmar que es posible relacionar las respuestas relacionadas con el contenido de carbohidratos con la respuesta obtenida a través del electrodo de cobre a lo largo del tiempo para este grupo de fermentaciones realizadas.

Tabla 4-25. Parámetros del modelo lineal múltiple para la señal con electrodo de cobre y fermentación con hierbas

Variable	Valor	Error estándar
Intercepto	25,0796	2,7112
Azúcares totales	1,7164	0,6803
Sacarosa	-3,8341	2,3259
Glucosa	-5,4276	2,4054
Fructosa	7,4807	1,3099

Tabla 4-26. Variables estadísticas para modelo lineal múltiple para la señal con electrodo de cobre y fermentación con hierbas

Variable	Valor
Residual de la suma de cuadrados	1262,6408
R Cuadrado ajustado	0,9449
Root-MSE (SD)	7,1067

En el caso de la correlación encontrada para la respuesta obtenida mediante el electrodo de platino, se presentan a continuación los parámetros obtenidos en las tablas 4-27 y 4-28. Dicho modelo posee un coeficiente de regresión con un valor superior a 0.67, lo cual permite afirmar que es posible relacionar la acidez, la concentración de etanol, el rendimiento y la productividad con la respuesta obtenida a través del electrodo de platino a lo largo del tiempo para este grupo de fermentaciones realizadas.

Tabla 4-27. Parámetros del modelo lineal múltiple para la señal con electrodo de platino y fermentación con hierbas y fermentación con hierbas

Variable	Valor	Error estándar
Intercepto	-1,0964	1,3357
Acidez	1,44E+01	8,7895
Etanol	4,17E-02	0,5465
Y p/s	9,7284	10,6464
Productividad	1,6159	2,6109

Tabla 4-28. Variables estadísticas para modelo lineal múltiple para la señal con electrodo de platino y fermentación con hierbas

Variable	Valor
Residual de la suma de cuadrados	106,5394
R Cuadrado ajustado	0,6738
Root-MSE (SD)	2,0644

4.4 Fermentaciones con frutos rojos, diferentes fuentes de nitrógeno y diferentes tratamientos de higienización

Se utilizaron las materias primas explicadas en los numerales 2.1.1, 2.1.2, 2.1.3, 2.1.4 y 2.1.6. Se emplearon las condiciones del numeral 2.2 para llevar a cabo la fermentación. Se utilizó miel cristalizada, y como modificadores se emplearon frutos rojos locales tales como corozo (*Bactris minor*) y agraz (*Vaccinum floribundum HBK*). Las fermentaciones se realizaron de acuerdo con la metodología propuesta por Blanco et al. 2014, para la utilización de ambas frutas. Con el fin de evaluar el efecto del tipo de tratamiento de higienización del mosto (proceso de sulfitación (Baumes 2009) o pasteurización) y de la fuente de nitrógeno utilizado (fosfato de diamonio o adición de polen (Mendes-Ferreira et al. 2010)), se llevaron a cabo cuatro ensayos. Dichas fermentaciones se llevaron a cabo a lo largo de 19 días. Dichas fermentaciones se llevaron a cabo a lo largo de 19 días. En la tabla 4-29 se pueden observar las condiciones para cada uno de los ensayos llevados a cabo.

Tabla 4-29. Condiciones de los ensayos de fermentación utilizando frutos rojos (A) Agraz (C) Corozo

Ensayo	Fruta	Fuente de nitrógeno	Método de higienización
1	1A 1C	Polen	Pasteurización
2	2A 2C	Fosfato de diamonio	Pasteurización
3	3A 3C	Polen	Sulfitación
4	4A 4C	Fosfato de diamonio	Sulfitación

En las figuras 4-50 y 4-51 se presentan los resultados obtenidos para el sensor de platino y el sensor de grafito modificado con cobre (respectivamente). Realizando un análisis de Kruskal-Wallis con 95% de significancia, se encuentra que todas las fermentaciones

presentaron un comportamiento diferente a lo largo del tiempo. Estos resultados confirman los observados en el numeral 4.1, así como los observados por (Wintersteen et al. 2005), ya que el tratamiento de higienización así como la adición de materiales de origen vegetal afecta la velocidad de fermentación. Adicionalmente, la composición de cada una de las frutas empleadas es diferente, ocasionando así mismo que el comportamiento de la levadura sea completamente diferente al observado con la adición de hierbas. Sin embargo, los resultados presentados en la figura 4-50 no permiten evidenciar una tendencia clara en las señales obtenidas, probablemente debido a la presencia de otro tipo de sustancias que pueden interferir, como compuestos fenólicos (antioxidantes), así como la acidez propia de las frutas.

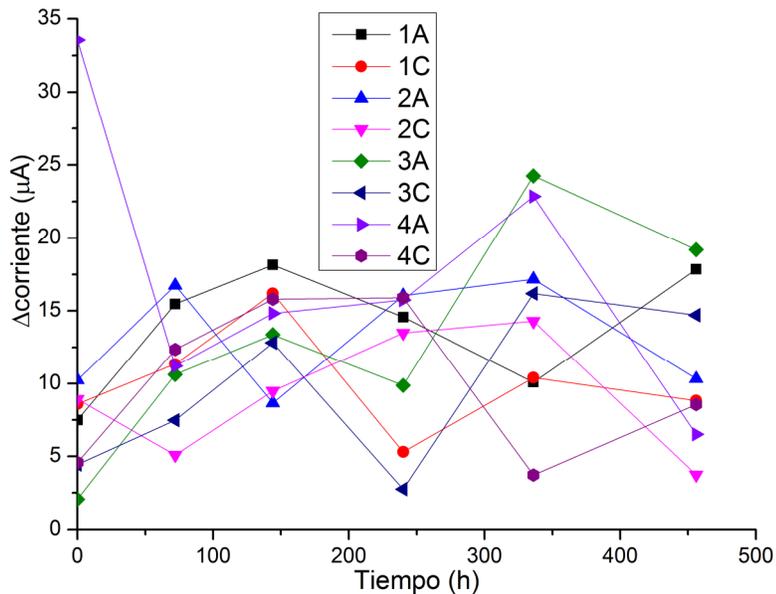


Figura 4-50. Monitoreo de fermentación de hidromieles con agraz y corozo, con electrodo de platino (AC1W2R1) y ácido perclórico y cloruro de potasio como búfer

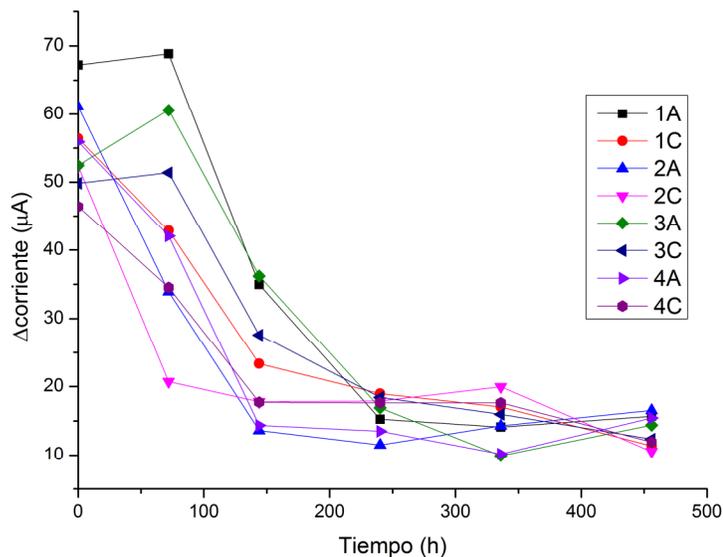


Figura 4-51. Monitoreo de fermentación de hidromieles con agraz y corozo, con electrodo de grafito (AC1W4R2) modificado con cobre y NaOH 0.1 M como búfer

En las figuras 4-52 a 4-54 puede observarse el comportamiento para la acidez total, los azúcares totales, así como para la producción de etanol tanto para los hidromieles realizados con el agraz como con el corozo, evaluando también diferentes fuentes de nitrógeno y diferentes tratamientos de higienización del mosto.

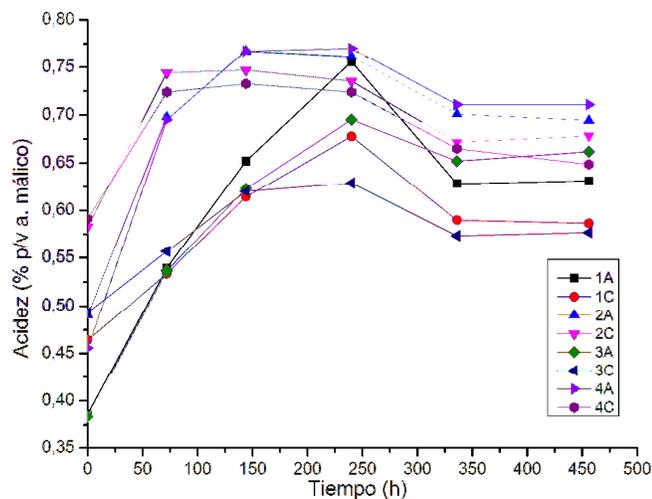


Figura 4-52. Acidez total para fermentación de hidromieles con agraz y corozo

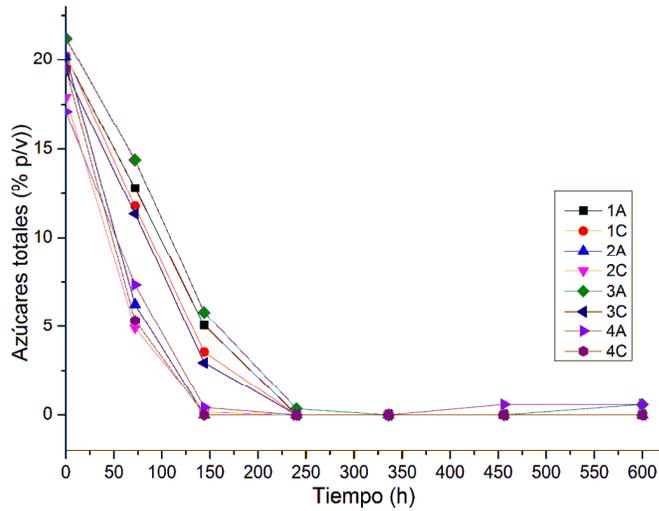


Figura 4-53. Monitoreo de azúcares totales para fermentación de hidromieles con agraz y corozo utilizando HPLC

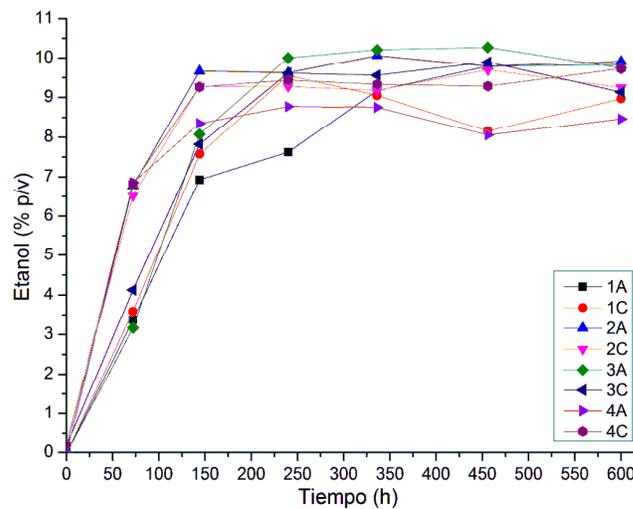


Figura 4-54. Monitoreo de etanol para fermentación de hidromieles con agraz y corozo utilizando HPLC

Estos resultados muestran mayores valores para la acidez total debido a la presencia de fruta en la fermentación, al ser comparados con los valores obtenidos para aquellas sin adición de fruta, y velocidad más alta para el consumo de azúcares, probablemente debido al contenido de vitaminas y otros micronutrientes que hacen que la velocidad de consumo de azúcares sea mayor. En el caso de las señales obtenidas con el sistema electroquímico, se pueden observar tendencias decrecientes para todas las fermentaciones utilizando el electrodo de grafito modificado con cobre; sin embargo, con el electrodo de platino las

tendencias no son claras; esto puede deberse precisamente a la presencia de otras sustancias que pueden afectar las señales obtenidas, así como la utilización de métodos de higienización diferentes, lo cual hace que las señales no presenten una tendencia clara. Los resultados mostrados no muestran un efecto importante del método de higienización sobre el consumo de azúcares o de producción de etanol. Por el contrario, se demuestra que la adición de una fuente de nitrógeno como el fosfato de diamonio reduce el tiempo de fermentación en comparación con el polen, lo cual se atribuye a la complejidad de la estructura del polen y la baja disponibilidad de nitrógeno y demás nutrientes al inicio de la fermentación en estos ensayos.

Se realizó un análisis de componentes principales mediante el cual se explica el 85.41% de la varianza total de los datos y es presentado en la figura 4-55. Éste, se nota que las mediciones tienen mayor relación con las señales que provienen del electrodo de cobre y varían desde el cuadrante izquierdo hacia el derecho a medida que el tiempo de fermentación va avanzando. Sin embargo, con el electrodo de platino, no se observa ninguna relación con las demás variables determinadas, como además se evidencia en la tabla 4-30.

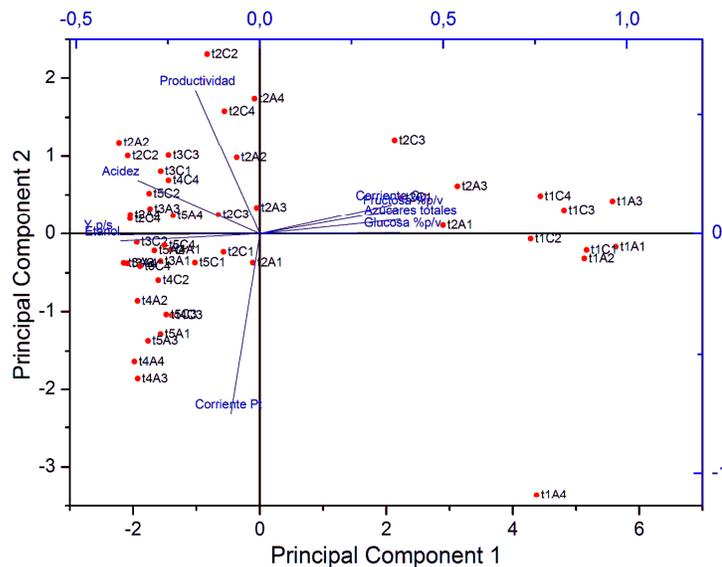


Figura 4-55. Análisis de componentes principales para fermentaciones con frutos rojos, diferentes fuentes de nitrógeno y tratamientos de higienización

Tabla 4-30. Matriz de Correlación para análisis de componentes principales para fermentaciones con frutos rojos, diferentes fuentes de nitrógeno y tratamientos de higienización

Variable	ΔI sensor Cu (μA)	ΔI sensor Pt (μA)
Glucosa	0,8955	-0,2130
Fructosa	0,9538	-0,1784
Azúcares totales	0,9355	-0,1951
Etanol	-0,9117	0,1748
Acidez	-0,7589	0,1273
Y p/s	-0,9153	0,1569
Productividad	-0,1907	0,0636
Corriente Cu	1,0000	-0,1219
Corriente Pt	-0,1219	1,0000

Por lo tanto, se planteó un modelo lineal multivariado, cuyos parámetros son presentados en las tablas 4-31 y 4-32, para la señal obtenida con el electrodo de cobre, relacionada con el contenido de azúcares fermentables, glucosa y fructosa, notándose el alto coeficiente de correlación mayor a 0.9, lo cual permite afirmar que el uso del electrodo de cobre para este grupo de fermentaciones es útil para establecer las relaciones a lo largo del tiempo de las diferentes muestras analizadas.

Tabla 4-31. Parámetros del modelo lineal múltiple para la señal con electrodo de cobre y fermentaciones con frutos rojos

Variable	Valor	Error estándar
Intercepto	14,8418	1,0946
Glucosa	1,24E+14	1,26E+14
Fructosa	1,24E+14	1,26E+14
Azúcares totales	-1,24E+14	1,26E+14

Tabla 4-32. Variables estadísticas para modelo lineal múltiple para la señal con electrodo de cobre y fermentaciones con frutos rojos

Variable	Valor
Residual de la suma de cuadrados	1134,2336
R Cuadrado ajustado	0,9191
Root-MSE (SD)	5,1359

4.5 Fermentación de hidromiel tradicional y determinación de perfil con lengua y nariz electrónica comerciales

Se llevaron a cabo fermentaciones utilizando insumos italianos (miel cristalizada, polen como fuente de nitrógeno), y se utilizaron las condiciones del numeral 2. Se utilizó el sistema electroquímico Metrohm, y electrodo de carbón vítreo modificado con cobre. En la figura 4-56 se pueden observar los resultados correspondientes a la fermentación realizada, la cual presenta una tendencia similar a la de los resultados presentados anteriormente, donde se observa un comportamiento decreciente para el cambio de la corriente a lo largo del tiempo.

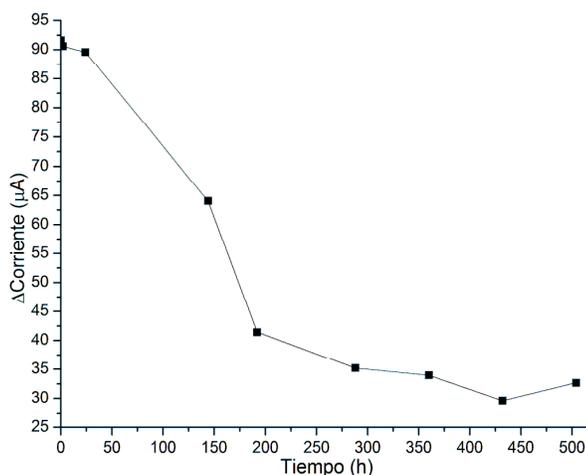


Figura 4-56. Monitoreo de la corriente utilizando electrodo de carbón vítreo modificado con cobre y NaOH 0.1M como búfer

También se llevó a cabo el monitoreo del proceso fermentativo utilizando la nariz electrónica, de acuerdo con lo descrito en el numeral 2.5.5. En la figura 4-57 a y b se presentan ejemplos de las señales obtenidas mediante los sensores W2S (relacionado con compuestos aromáticos) y W1C (relacionado con compuestos alcohólicos), respectivamente. Para ambos casos observados se observan cambios a lo largo del tiempo relacionados con el proceso que se está llevando a cabo, así como posiblemente con la señal obtenida en el caso de la diferencia de corriente, presentados en la figura 4-57.

En la figura 4-58 se presentan los resultados obtenidos mediante la utilización de la lengua comercial para el monitoreo de la fermentación con la metodología descrita en el numeral

2.5.6. Como se mencionó, las señales se relacionan con las características sensoriales de las muestras analizadas, las cuales van cambiando a lo largo del tiempo. Dichos cambios son claros para los atributos dulce, ácido, amargo y salado, y menos importantes para la astringencia y los retrogustos. En las figuras 4-59 a 4-61 se presenta el comportamiento observado para la acidez total, así como para el contenido de azúcares totales y etanol. Estos resultados concuerdan con los observados anteriormente en las fermentaciones realizadas.

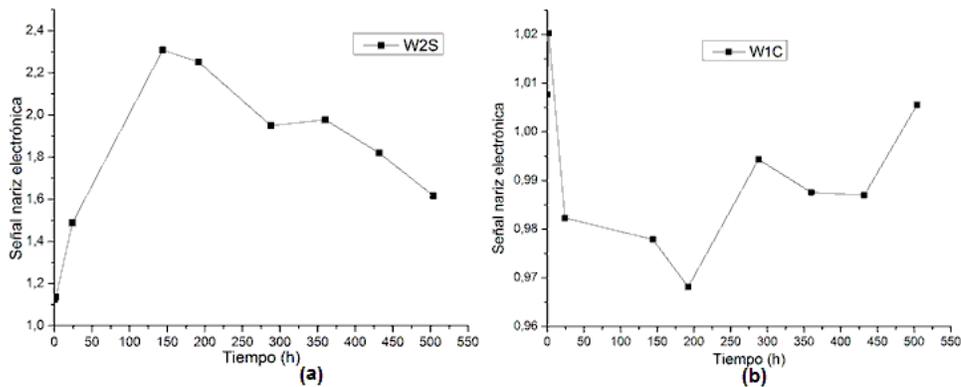


Figura 4-57. Monitoreo de dos tipos de señales obtenidas mediante la utilización de nariz electrónica comercial

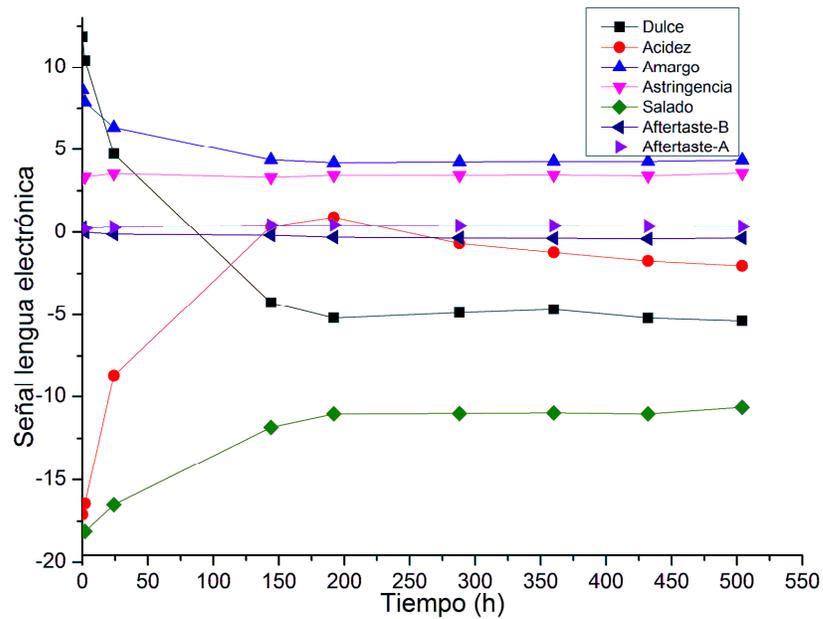


Figura 4-58. Monitoreo de las señales obtenidas mediante la utilización de lengua electrónica comercial

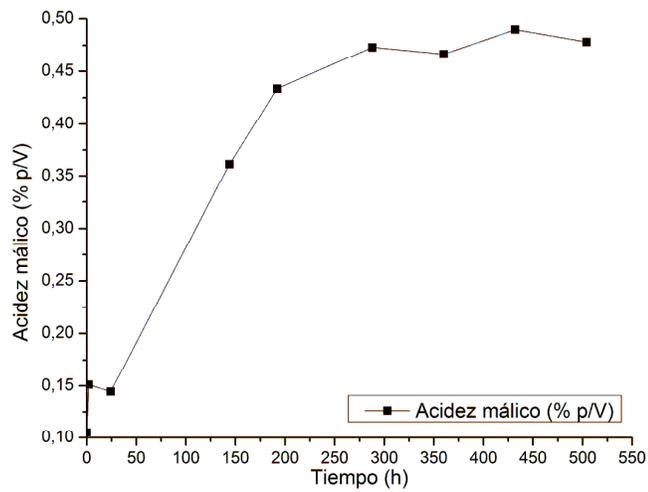


Figura 4-59. Monitoreo de acidez total a lo largo de fermentación

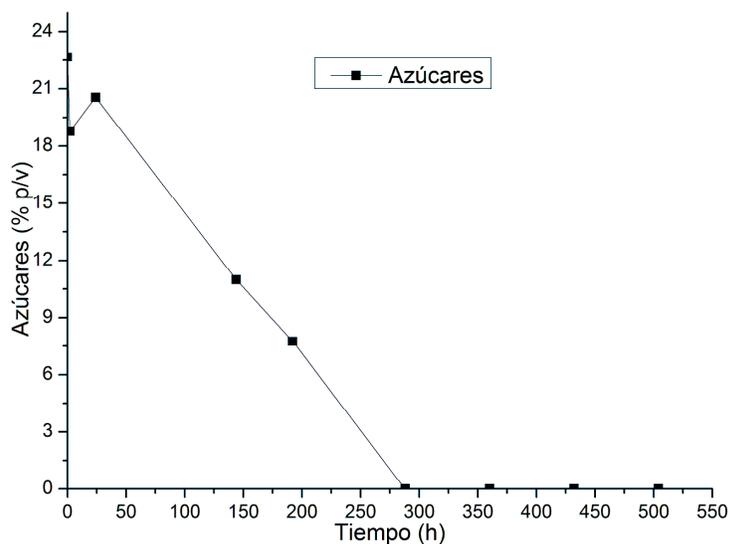


Figura 4-60. Monitoreo de azúcares totales a lo largo de fermentación utilizando HPLC

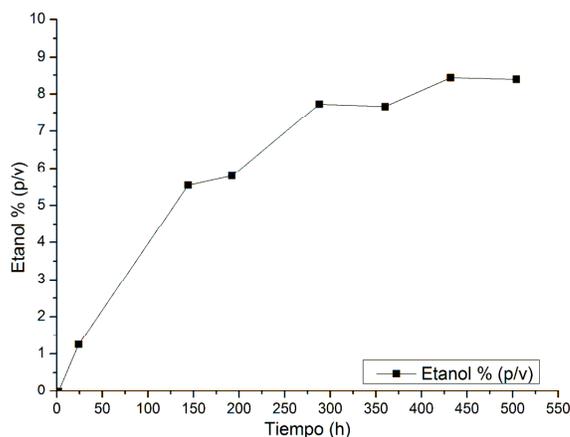


Figura 4-61. Monitoreo de producción de etanol a lo largo de fermentación utilizando HPLC

Al realizar un análisis de componentes principales de todos los datos utilizados, se puede explicar el 91.38% de la varianza total de los datos. Se puede observar como a lo largo del tiempo van cambiando las señales obtenidas para todas las variables determinadas. Adicionalmente, se observa alta correlación entre la señal obtenida mediante el electrodo de cobre, el contenido de azúcares totales, glucosa y fructosa, así como con algunos de los sensores de la nariz electrónica y la lengua electrónica comerciales, especialmente con el que es sensible a compuestos alifáticos de cadena corta (W3S) y a compuestos alifáticos

clorados (W2W), y a los sensores relacionados con el sabor dulce, amargo y retrogusto B, como se observa en la matriz de correlación de los datos presentada en la tabla 4-33, probablemente debido a todos los cambios que sufre el mosto a lo largo del tiempo de fermentación tanto en la parte de compuestos volátiles como en la parte de compuestos no volátiles, que influyen en sus características sensoriales y fisicoquímicas.

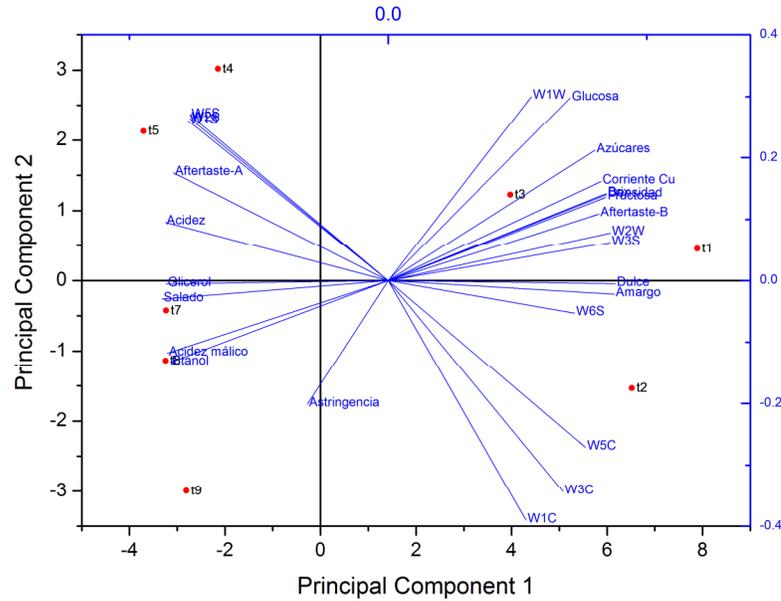


Figura 4-62. Análisis de componentes principales para fermentación tradicional y análisis con nariz y lengua electrónica comerciales

Tabla 4-33. Matriz de Correlación para análisis de componentes principales para fermentación tradicional y análisis con nariz y lengua electrónica comerciales

Variable	ΔI sensor Cu (μA)
Fructosa	0.9882
Brix	0.9865
Densidad	0.9853
Azúcares	0.9815
W3S	0.9321
W2W	0.9312
Glucosa	0.9204
Dulce	0.9150
Amargo	0.8898
Aftertaste-B	0.8813
W6S	0.7989

Continuación Tabla 4-33 Matriz de Correlación para análisis de componentes principales para fermentación tradicional y análisis con nariz y lengua electrónica comerciales

Variable	ΔI sensor Cu (μA)
W5C	0.6494
W1W	0.6482
W3C	0.5091
W1C	0.3648
Astringencia	-0.3804
W5S	-0.6588
W2S	-0.6595
W1S	-0.6609
Aftertaste-A	-0.7717
Acidez	-0.8442
Glicerol	-0.9301
Salado	-0.9517

Adicionalmente, se construyó un modelo lineal multivariado teniendo en cuenta las principales relaciones encontradas en la matriz de correlación, y cuyos resultados se presentan en las tablas 4-34 y 4-35, donde se muestra claramente que el coeficiente de relación es 1, demostrando que las determinaciones realizadas tienen una relación directa con la señal del electrodo de cobre.

Tabla 4-34. Parámetros del modelo lineal múltiple para la señal con electrodo de cobre y fermentación de hidromiel tradicional con análisis con nariz y lengua electrónica

Variable	Valor	Error estándar
Intercepto	-8401.1727	3304.2593
W6S	231.8595	1537.4969
W5C	344.6406	127.5537
W1W	-2213.5942	980.5948
W2W	16036.8945	103.5285
W3S	-5721.3697	552.2746
Dulce	8.5604	0.8914
Amargo	-70.3033	11.3622
Aftertaste-B	72.7241	3.7491
Azúcares	3.2590	1.6096
Glucosa	0.4512	1.9047
Fructosa	-2.4039	2.9068

Tabla 4-35. Variables estadísticas para modelo lineal múltiple para la señal con electrodo de cobre y fermentación tradicional con análisis con nariz y lengua electrónica

Variable	Valor
Residual de la suma de cuadrados	2.67E-27
R Cuadrado ajustado	1.0000
Root-MSE (SD)	1.33E-14

4.6 Determinación de perfil sensorial de fermentación de hidromiel tradicional.

Se llevó a cabo esta fermentación utilizando insumos colombianos (miel cristalizada, polen como fuente de nitrógeno), y se utilizaron las condiciones del numeral 2. Éstas se realizaron por duplicado, y se preparó un mosto de 25°Brix, el cual fue fermentado a lo largo de 500 horas. Se llevaron a cabo determinaciones fisicoquímicas, con el sistema de gusto artificial y con pánel sensorial.

En las figuras 4-63 y 4-64 se presentan los resultados obtenidos para el sensor de platino y el sensor de grafito modificado con cobre (respectivamente). La tendencia observada es la misma que se presentó en las fermentaciones previamente evaluadas, y coinciden con los resultados en las cuales la señal obtenida utilizando el sensor modificado con cobre presenta valores que disminuyen a lo largo del tiempo de fermentación, mientras que en el caso de las señales obtenidas con el electrodo de platino, aumentan a medida que se desarrolla la presentación, confirmando que es posible realizar el monitoreo a lo largo del tiempo utilizando el sistema de gusto artificial.

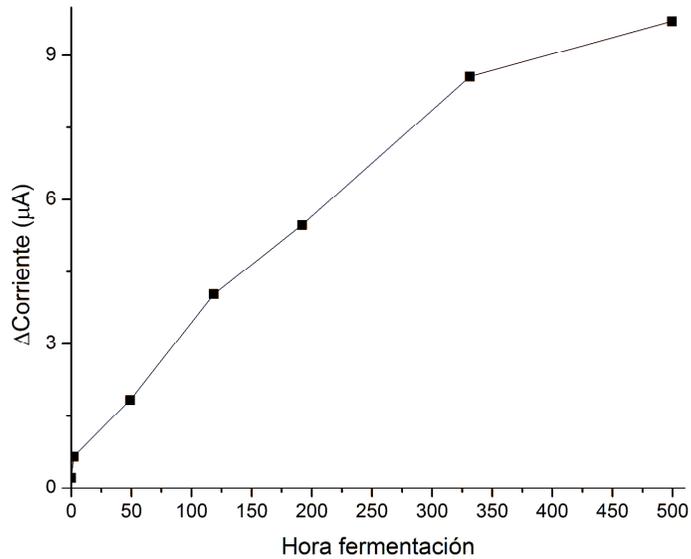


Figura 4-63. Monitoreo de fermentación de hidromiel tradicional, con electrodo con electrodo de platino (AC1W2R1) y ácido perclórico y cloruro de potasio como búfer

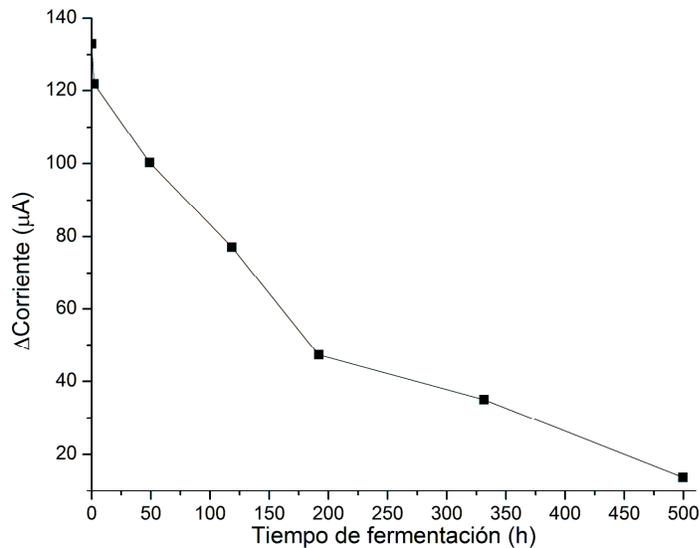


Figura 4-64. Monitoreo fermentación de hidromiel tradicional, con electrodo de grafito (AC1W4R2) modificado con cobre y NaOH 0.1 M como búfer

Estos resultados tienen relación con los obtenidos mediante diferentes determinaciones fisicoquímicas, mediante las cuales se confirmó el comportamiento a lo largo del tiempo de la fermentación alcohólica, como se puede observar en las figuras 4-65 a 4-68, en las

cuales se muestra el comportamiento de la acidez total, consumo de azúcares totales y producción de etanol a lo largo del tiempo.

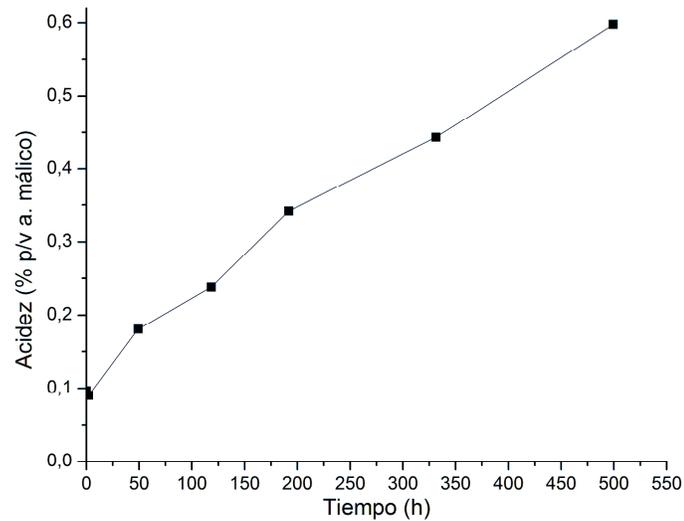


Figura 4-65. Monitoreo de acidez total para fermentación de hidromiel tradicional

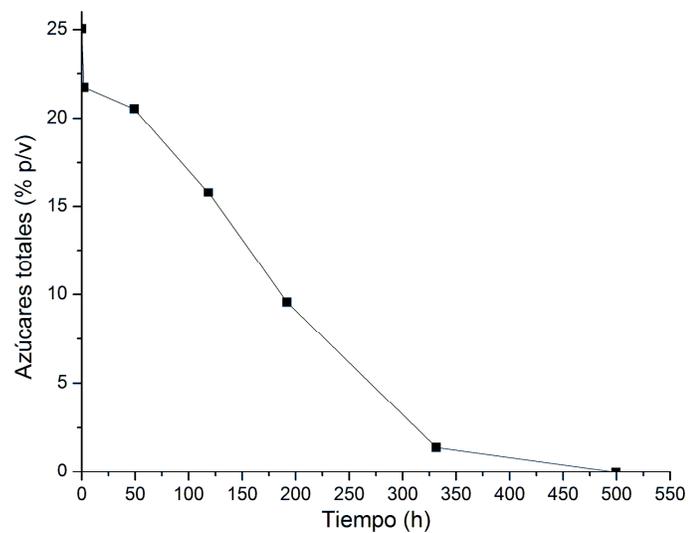


Figura 4-66. Monitoreo de consumo de azúcares totales mediante HPLC para fermentación de hidromiel tradicional

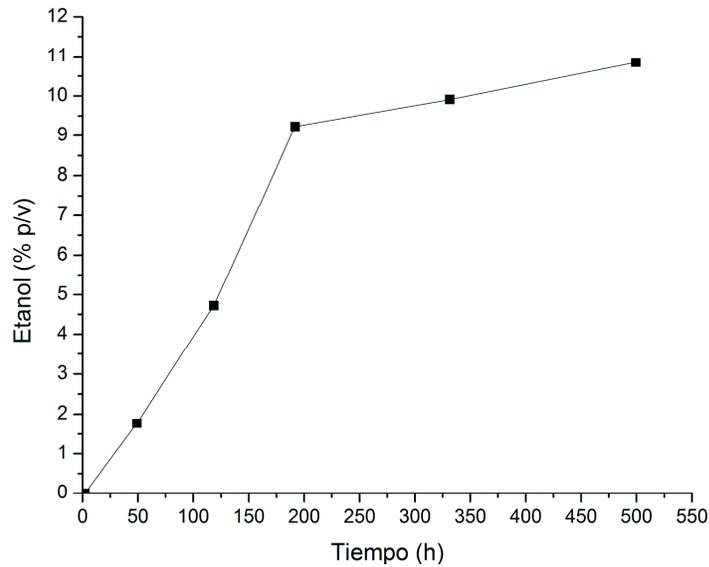


Figura 4-67. Monitoreo de concentración de etanol para fermentación de hidromiel tradicional mediante HPLC

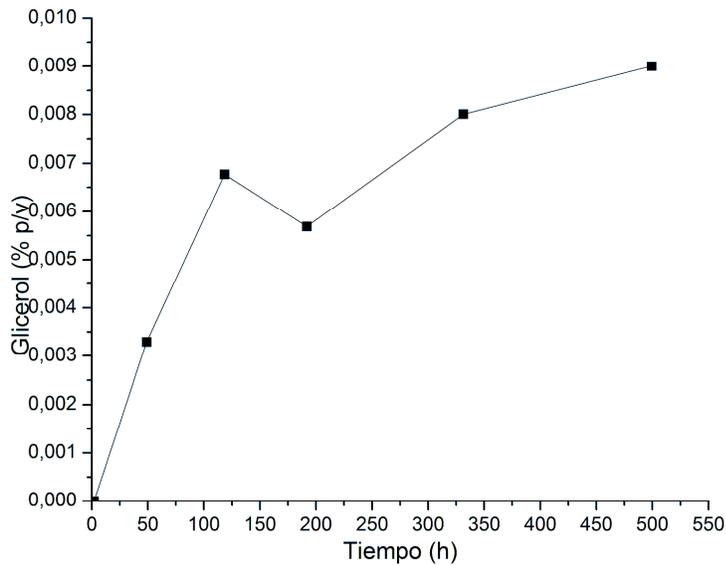


Figura 4-68. Monitoreo de concentración de glicerol para fermentación de hidromiel tradicional mediante HPLC

Adicionalmente, se llevó a cabo el monitoreo del perfil sensorial a lo largo de la fermentación con un panel sensorial entrenado de 8 personas, utilizando la metodología presentada en el numeral 2.4.

Se presentan en las figuras 4-69 y 4-70 los diferentes atributos sensoriales promedio evaluados a lo largo de la fermentación para la obtención del hidromiel tradicional. En la figura 4-69 se presentan las características evaluadas mediante una escala no estructurada de 7 puntos; en la 4-70 se presentan las características evaluadas mediante rangos de cuatro niveles, los cuales correspondían a ausencia, presencia baja, media y alta. Estos resultados obtenidos a través del panel sensorial permiten establecer la relación que tienen las características sensoriales típicas de un hidromiel y su cambio a lo largo del tiempo por acción del metabolismo fermentativo de la levadura.

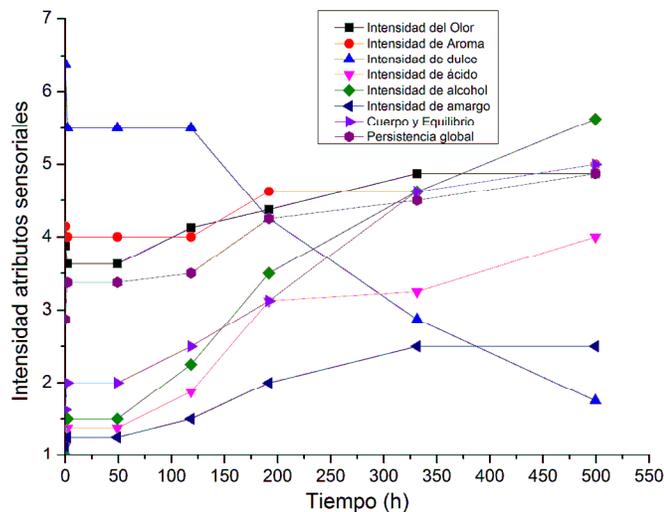


Figura 4-69. Características sensoriales a lo largo del tiempo de fermentación para obtención de un hidromiel tradicional

Al realizar el análisis de componentes principales, el cual se presenta en la figura 4-71, el cual explica el 95.52% de la varianza total de los datos, se nota que la señal obtenida mediante el sensor de cobre se relaciona con la presencia de carbohidratos, mientras que para el caso de la señal obtenida mediante el sensor de platino, se presenta relación con la concentración de etanol, glicerol, el rendimiento, así como características sensoriales importantes tales como amargo, sabor a alcohol, entre otras. Esto es confirmado a través de la matriz de correlación, presentada en la tabla 4-36, en la cual se observan las correlaciones anteriormente mencionadas.

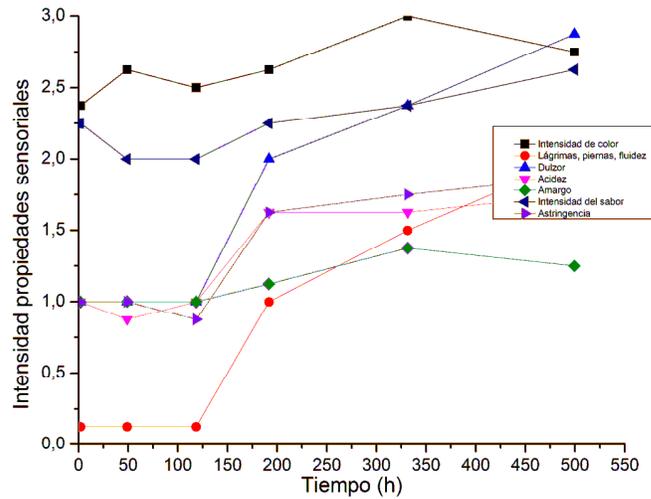


Figura 4-70. Características sensoriales a lo largo del tiempo de fermentación para obtención de un hidromiel tradicional

Tabla 4-36. Matriz de correlación de datos para fermentación para obtención de hidromiel tradicional

Variable	ΔI sensor Cu (μA)	ΔI sensor Pt (μA)
Olor	-0,9196	0,9613
Aroma	-0,8756	0,8857
Sabor dulce	0,9310	-0,9579
Sabor ácido	-0,9736	0,9662
Sabor alcohol	-0,9686	0,9864
Amargo	-0,9589	0,9818
Cuerpo y Equilibrio	-0,9427	0,9830
Persistencia global	-0,9709	0,9643
Intensidad de color	-0,8144	0,8490
Lágrimas, piernas, fluidez	-0,9130	0,9430
Dulzor	-0,9190	0,9403
Acidez	-0,8981	0,8980
Amargo	-0,8264	0,8917
Intensidad del sabor	-0,5913	0,6643
Astringencia	-0,8819	0,8923
Azúcares totales	0,9173	-0,9667
Glucosa	0,9173	-0,9667
Fructosa	0,9173	-0,9667
Acidez	-0,9737	0,9845
Glicerol	-0,9209	0,8588
Etanol	-0,9673	0,9422
Y p/s	-0,9673	0,9422
Productividad	-0,5499	0,4246
Corriente Cu	1,0000	-0,9826
Corriente Pt	-0,9826	1,0000

Adicionalmente, se llevaron a cabo dos modelos lineales multivariados para las señales obtenidas mediante el electrodo de cobre y del electrodo de platino, cuyos parámetros se presentan en las tablas 4-37 a 4-40, en las cuales se observan los parámetros estadísticos de dichos modelos, en el cual se observan coeficientes de correlación altos, sobre todo para el electrodo de platino, pues dicho valor es 1.0. Esto evidencia entonces las relaciones que existen entre las señales determinadas mediante el análisis sensorial y las señales obtenidas mediante los sensores evaluados.

Tabla 4-37. Parámetros del modelo lineal múltiple para la señal con electrodo de cobre y fermentación de hidromiel tradicional

Variable	Valor	Error estándar
Intercepto	-23,5493	17,8173
Sabor dulce	17,2763	7,8151
Azúcares totales	-49436,9910	533599,7148
Glucosa	49438,2841	533599,0884
Fructosa	49438,2841	533599,0884

Tabla 4-38. Variables estadísticas para modelo lineal múltiple para la señal con electrodo de cobre y fermentación de hidromiel tradicional

Variable	Valor
Residual de la suma de cuadrados	6099,0131
R Cuadrado ajustado	0,8606

Tabla 4-39. Parámetros del modelo lineal múltiple para la señal con electrodo de platino y fermentación de hidromiel tradicional

Variable	Valor	Error estándar
Intercepto	14,0906	1,19E-13
Olor	-14,5265	8,44E-14
Aroma	18,8524	8,02E-14
Sabor ácido	-0,0224	6,79E-14
Sabor alcohol	-7,6203	6,43E-14
Amargo	30,1942	1,83E-13
Cuerpo y Equilibrio	-3,9322	8,05E-14
Persistencia global	1,3494	3,29E-14
Intensidad de color	4,1107	3,10E-14

Continuación tabla 4-39 Parámetros del modelo lineal múltiple para la señal con electrodo de platino y fermentación de hidromiel tradicional

Variable	Valor	Error estándar
Lágrimas, piernas, fluidez	34,6532	6,66E-14
Dulzor	9,4707	5,89E-14
Acidez	-10,0480	2,67E-14
Amargo	-1,9688	9,51E-14
Astringencia	-66,0406	1,13E-13
Acidez	-51,5821	1,17E-13
Glicerol	7,2211	1,45E-14
Etanol	0,9065	1,70E-15
Y p/s	25,2933	4,37E-14

Tabla 4-40. Variables estadísticas para modelo lineal múltiple para la señal con electrodo de platino y fermentación de hidromiel tradicional

Variable	Valor
Residual de la suma de cuadrados	1,90E-60
R Cuadrado ajustado	1,0000

5. Evaluación de hidromieles

En este capítulo se muestra la evaluación de los diferentes productos finales obtenidos a través de las fermentaciones realizadas, así como de diferentes hidromieles comerciales, de acuerdo con lo especificado en el numeral 2.7.1 y la tabla 2-1.

Se realizaron evaluaciones analíticas, especificadas en el numeral 2.3, así como las evaluaciones con el sistema de gusto artificial, utilizando los electrodos de platino y carbono modificado con cobre.

En el caso de los hidromieles comerciales, se realizó la evaluación sensorial, de acuerdo con lo especificado en el numeral 2.4.

5.1 Evaluación de hidromieles obtenidos a lo largo de las diferentes fermentaciones

Se caracterizaron los diferentes hidromieles obtenidos para las fermentaciones evaluadas, de acuerdo con las diferentes metodologías analíticas reportadas en los numerales 2.5.3.

5.1.1 Fermentaciones con adición de especias y con diferentes insumos

- **Fermentaciones con insumos colombianos**

De acuerdo con los resultados presentados en el numeral 4.2.1, y reportando los resultados obtenidos con la determinación de la actividad antioxidante, en la tabla 5-1 se presentan los resultados obtenidos para cada una de los hidromieles obtenidos. En la tabla 5-2 se presentan los resultados calculados para el rendimiento y productividad de la fermentación evaluada. Realizando un análisis ANOVA Kruskal Wallis, utilizando 95% de confiabilidad, se observa que para estos hidromieles obtenidos existen diferencias significativas entre todas las variables determinadas.

Tabla 5-1 Resultados de variables fisicoquímicas determinadas para hidromieles con adición de especias e insumos colombianos

Muestra	Acido málico (% p/V)	Azúcares fermentables (%P/V)	Etanol (%P/V)	Glicerol (%P/V)	ΔI sensor Cu (μA)	ΔI sensor Pt (μA)	Fenoles Totales (g ácido gálico/L)	FRAP (mmol FeSO4/L)	ABTS (mmol Trolox/L)
1	0,7359	0,0000	7,0278	0,0078	8,8569	3,7781	0,1975	85,8638	0,0563
2	0,8804	0,0000	6,6188	0,0078	8,2563	1,2453	0,2730	133,3714	0,0603
3	0,8016	0,0000	5,9901	0,0096	12,0594	2,0235	0,6419	246,4164	0,1581
4	1,1695	0,0000	3,9740	0,0114	11,5609	6,0001	0,5979	282,2743	0,1378

Tabla 5-2 Rendimiento y productividad para hidromieles con adición de especias e insumos colombianos

Muestra	Y p/s g etanol/g azúcares	Productividad g etanol / l ^h
1	0,3163	0,1958
2	0,3228	0,1844
3	0,2745	0,1669
4	0,1837	0,1107

▪ **Fermentación con insumos italianos**

De acuerdo con los resultados presentados en el numeral 4.2.2, y reportando los resultados obtenidos con la determinación de la actividad antioxidante, en la tabla 5-3 se presentan los resultados obtenidos para cada una de los hidromieles obtenidos. En la tabla 5-4 se presentan los resultados calculados para el rendimiento y productividad de la fermentación evaluada. Realizando un análisis ANOVA Kruskal Wallis, utilizando 95% de confiabilidad, se observa que para estos hidromieles obtenidos existen diferencias significativas entre todas las variables determinadas.

Tabla 5-3 Resultados de variables fisicoquímicas determinadas para hidromieles con adición de especias e insumos italianos

Muestra	Acido málico (% p/V)	Azúcares fermentables (%P/V)	Etanol (%P/V)	Glicerol (%P/V)	ΔI sensor Cu (μA)	ΔI sensor Pt (μA)	Fenoles Totales (g ácido gálico/L)	FRAP (mmol FeSO4/L)	ABTS (mmol Trolox/L)
1	0,9330	0,0000	5,4746	0,0095	8,7235	1,4781	0,3928	110,5112	0,0526
2	0,8542	0,0000	4,1413	0,0091	8,0797	2,2094	0,3204	170,0074	0,0632
3	0,7753	0,0000	4,9660	0,0107	14,3813	9,8828	0,7382	57,4656	0,1409
4	1,1301	0,0000	3,3299	0,0110	18,2281	8,7907	0,6875	260,5366	0,1409

Tabla 5-4 Rendimiento y Productividad para hidromieles con adición de especias e insumos italianos

Muestra	Y p/s g etanol/g azúcares	Productividad g etanol / l* ^h
1	0,2414	0,1525
2	0,1792	0,1154
3	0,2033	0,1383
4	0,1468	0,0928

5.1.2 Hidromieles con adición de hierbas y especias

De acuerdo con los resultados presentados en el numeral 4.3, y reportando los resultados obtenidos con la determinación de la actividad antioxidante, en la tabla 5-5 se presentan los resultados obtenidos para cada una de los hidromieles obtenidos. En la tabla 5-6 se presentan los resultados calculados para el rendimiento y productividad de la fermentación evaluada. Realizando un análisis ANOVA Kruskal Wallis, utilizando 95% de confiabilidad, se observa que para estos hidromieles obtenidos existen diferencias significativas para todas las variables determinadas.

Tabla 5-5 Resultados de variables fisicoquímicas determinadas para hidromieles con adición de hierbas y especias

Muestra	Acido málico (% p/V)	Azúcares fermentables (%P/V)	Etanol (%P/V)	ΔI sensor Cu (μA)	ΔI sensor Pt (μA)	Fenoles Totales (g ácido gálico/L)	FRAP (mmol FeSO ₄ /L)	ABTS (mmol Trolox/L)
B	0,2373	0,4664	12,0509	22,65	10,09	0,6095	206,7289	0,0618
Y	0,3573	0,5382	8,9215	25,05	6,21	0,9873	456,5020	0,0903
L	0,3654	0,4664	8,1186	20,67	7,24	0,5733	214,0429	0,0633
C	0,3466	2,1337	8,0269	19,65	6,83	0,7282	246,2245	0,0754
YL	0,3488	1,5949	8,2856	22,68	5,73	0,6862	339,8437	0,0913
YC	0,3457	1,7349	10,5408	25,49	6,86	0,5834	339,4780	0,0905

Tabla 5-6 Rendimiento y Productividad para hidromieles con adición de hierbas y especias

Muestra	Y p/s g etanol/g azúcares	Productividad g etanol / l*h
B	0,4987	0,3887
Y	0,3580	0,2878
L	0,3360	0,2619
C	0,3793	0,2589
YL	0,3808	0,2673
YC	0,4320	0,3400

5.1.3 Hidromieles con adición de frutos rojos, diferentes fuentes de nitrógeno y diferentes tratamientos de higienización

De acuerdo con los resultados presentados en el numeral 4.4, y reportando los resultados obtenidos con la determinación de la actividad antioxidante, en la tabla 5-7 se presentan los resultados obtenidos para cada una de los hidromieles obtenidos. En la tabla 5-8 se presentan los resultados calculados para el rendimiento y productividad de la fermentación evaluada. Realizando un análisis ANOVA Kruskal Wallis, utilizando 95% de confiabilidad, se observa que para estos hidromieles obtenidos existen diferencias significativas entre todas las variables determinadas.

Tabla 5-7 Resultados de variables fisicoquímicas determinadas para hidromieles con adición de agraz (A) y corozo (C), diferentes fuentes de nitrógeno y diferentes tratamientos de higienización

Muestra	Acido málico (% p/V)	Azúcares fermentables (%P/V)	Etanol (%P/V)	ΔI sensor Cu (μA)	ΔI sensor Pt (μA)	Fenoles Totales (g ácido gálico/L)	FRAP (mmol FeSO ₄ /L)	ABTS (mmol Trolox/L)
1A	0,6313	0,0000	9,8246	15,6938	17,8500	1,2815	494,1500	0,0987
2A	0,6946	0,0000	9,9112	16,5437	10,3370	1,1489	429,6263	0,1300
3A	0,6619	0,5797	9,7416	14,4063	19,1880	1,1577	483,2752	0,1263
4A	0,711	0,5797	8,4628	15,4438	6,5060	1,2864	443,4010	0,1881
1C	0,5865	0,0000	8,9714	11,3530	8,8250	0,6598	208,5705	0,0693
2C	0,6782	0,0000	9,2522	10,5560	3,7310	0,6490	159,7143	0,0422
3C	0,5767	0,0000	9,1359	12,3595	14,7120	0,6225	253,9038	0,0391
4C	0,6488	0,0000	9,7254	11,9375	8,5630	0,6618	186,9012	0,0631

Tabla 5-8 Rendimiento y Productividad para hidromieles con adición de hierbas y especias

Muestra	Y p/s g etanol/g azúcares	Productividad g etanol / l ³ h
1A	0,4877	0,1637
2A	0,4913	0,1652
3A	0,4592	0,1624
4A	0,4945	0,1410
1C	0,4431	0,1495
2C	0,5173	0,1542
3C	0,4722	0,1523
4C	0,4991	0,1621

5.2 Hidromieles comerciales

En el caso de los hidromieles comerciales, se determinaron las mismas variables fisicoquímicas determinadas en el numeral 5.2. En la tabla 5-9 se presentan los resultados obtenidos para cada una de las muestras evaluadas. Adicionalmente, se llevó a cabo la determinación del perfil sensorial de cada una de los hidromieles comerciales, a través de la utilización de un panel sensorial entrenado de ocho jueces, utilizando la metodología mencionada en el numeral 2.4. Dichos resultados se presentan en la tabla 5-10. Realizando un análisis estadístico ANOVA Kruskal Wallis con 95% de confiabilidad, tanto en el caso de las determinaciones fisicoquímicas como de las variables sensoriales se encontraron diferencias significativas entre todas las muestras evaluadas.

Tabla 5-9 Resultados de variables fisicoquímicas determinadas para hidromieles comerciales

Muestra	Acido málico (% p/V)	Azúcares fermentables (%P/V)	Etanol (%P/V)	Glicerol (%P/V)	ΔI sensor Cu (μA)	ΔI sensor Pt (μA)	Fenoles Totales (g ácido gálico/L)	FRAP (mmol FeSO4/L)	ABTS (mmol Trolox/L)
1	0,4291	1,2673	8,8151	0,00847	14,6641	7,8719	0,5102	111,7310	0,0214
2	0,4492	4,2346	12,0705	0,00844	34,6095	-2,7797	0,7026	112,9017	0,0337
3	0,3620	9,2537	10,2931	0,00728	34,6095	5,8781	0,2180	40,2371	0,0078
4	0,3754	0,0000	10,7105	0,00665	3,3203	4,2031	1,1413	183,4332	0,0499
5	0,3687	30,6749	7,2013	0,01238	44,4987	4,6234	0,4887	67,9457	0,0182
6	0,4626	17,8218	15,5800	0,00507	50,2845	7,8344	0,4489	78,6307	0,0160
7	0,4291	2,4979	11,8712	0,00832	28,3859	5,0172	0,5469	116,1941	0,0322
8	0,5699	8,1954	10,5518	0,00626	29,5609	3,9094	0,5750	193,3105	0,0559
9	0,4425	39,3357	3,0130	0,00000	39,8250	5,0703	0,4100	59,3977	0,0161

Muestra	Acido málico (% p/V)	Azúcares fermentables (%P/V)	Etanol (%P/V)	Glicerol (%P/V)	ΔI sensor Cu (μA)	ΔI sensor Pt (μA)	Fenoles Totales (g ácido gálico/L)	FRAP (mmol FeSO ₄ /L)	ABTS (mmol Trolox/L)
10	0,6805	10,4094	9,3899	0,00971	41,1516	5,9422	0,7034	143,7043	0,0368
11	0,4760	1,5751	10,5489	0,00981	28,3781	0,6063	0,9852	198,6809	0,1014
12	0,6235	2,3052	11,5863	0,00838	23,1672	5,4375	0,3957	73,0996	0,0423
13	0,4894	8,1993	11,5946	0,00829	22,4297	3,2438	0,2327	38,4986	0,0104
14	0,5967	1,0871	9,9204	0,00663	23,9672	3,2438	0,3086	67,4748	0,0176
15	0,5229	5,5346	11,3564	0,00967	30,9172	6,9532	0,3630	86,7802	0,0212
16	0,5028	5,6907	11,5718	0,00996	17,8391	4,3281	0,4073	91,7424	0,0236
17	0,4157	7,5617	11,5944	0,00902	22,0688	-0,0875	0,1938	34,0256	0,0076
18	0,3620	17,0440	10,0912	0,00000	49,7375	-0,0875	0,1244	41,0703	0,0050
19	0,3151	4,4583	13,1925	0,00515	13,8391	2,2547	0,1914	29,7333	0,0082

Tabla 5-10 Perfil sensorial obtenido para muestras comerciales

Muestra	Intensidad del Olor	Intensidad de Aroma	Intensidad de dulce	Intensidad de ácido	Intensidad de alcohol	Intensidad de amargo	Cuerpo y Equilibrio	Persistencia global
1	5,50	4,75	2,50	3,63	5,00	2,50	4,25	4,25
2	4,50	4,63	4,38	3,13	3,50	2,25	3,25	4,00
3	5,00	4,13	5,00	2,13	2,50	1,75	3,13	3,75
4	3,88	3,13	2,25	2,25	3,50	2,50	3,13	2,88
5	4,29	4,57	6,86	1,43	1,71	1,14	2,14	3,29
6	5,13	5,13	6,00	3,00	3,88	2,50	2,75	4,00
7	5,13	4,38	3,50	3,25	4,00	2,75	3,38	3,38
8	4,63	4,63	4,88	3,13	3,38	1,63	3,25	3,50
9	4,25	4,88	5,13	3,75	3,38	1,88	2,75	3,25
10	4,63	4,88	2,75	2,50	3,63	4,88	2,63	4,38
11	4,75	4,63	3,88	3,88	4,25	1,50	3,50	4,13
12	4,38	4,25	5,25	3,25	3,75	2,25	3,38	3,75
13	5,13	4,00	2,63	2,25	3,25	2,13	3,88	3,38
14	4,75	4,13	4,75	3,00	4,00	1,88	3,75	4,00
15	5,13	4,63	3,38	3,38	4,25	1,38	3,50	4,00
16	4,86	4,86	5,29	3,29	4,00	2,29	3,00	4,14
17	4,38	4,13	6,25	2,50	2,25	1,50	2,63	3,71
18	4,25	4,00	3,63	3,38	4,25	2,00	4,13	3,88
19	5,50	4,75	2,50	3,63	5,00	2,50	4,25	4,25

5.3 Análisis de componentes principales

Al realizar un análisis de componentes principales de todos los hidromieles evaluados, teniendo en cuenta las variables fisicoquímicas determinadas, se encontró que es posible llevar a cabo la clasificación de las diferentes muestras evaluadas utilizando todas las

variables determinadas. En la figura 5-1 se presentan los dos componentes principales, que explican el 67% de la variancia de las muestras. Se observa claramente que todas las muestras comerciales, ubicadas en el cuadrante izquierdo, son completamente diferentes del resto de los hidromieles evaluados. Adicionalmente, las muestras con adición de agraz ubicadas en el cuadrante superior derecho presentan características diferentes a las de corozo, ubicadas en el cuadrante derecho, pero en la mitad de la figura. El resto de muestras, aquellas con adición de hierbas y con adición de especias, también presentan características diferentes entre sí.

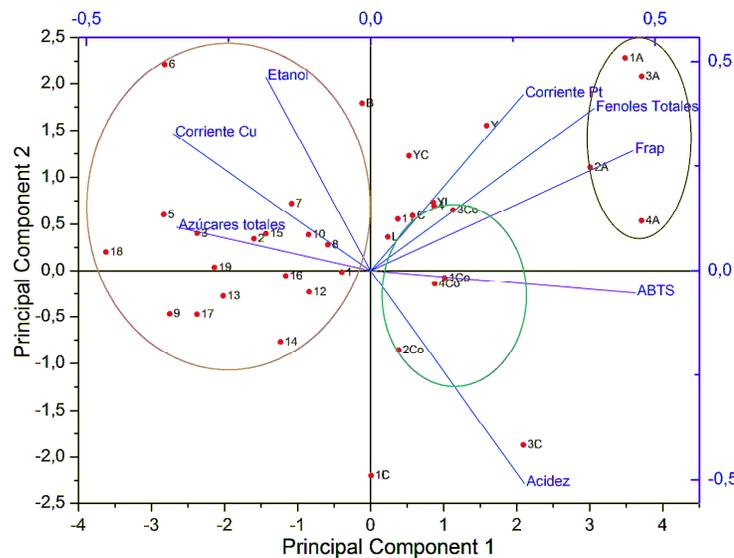


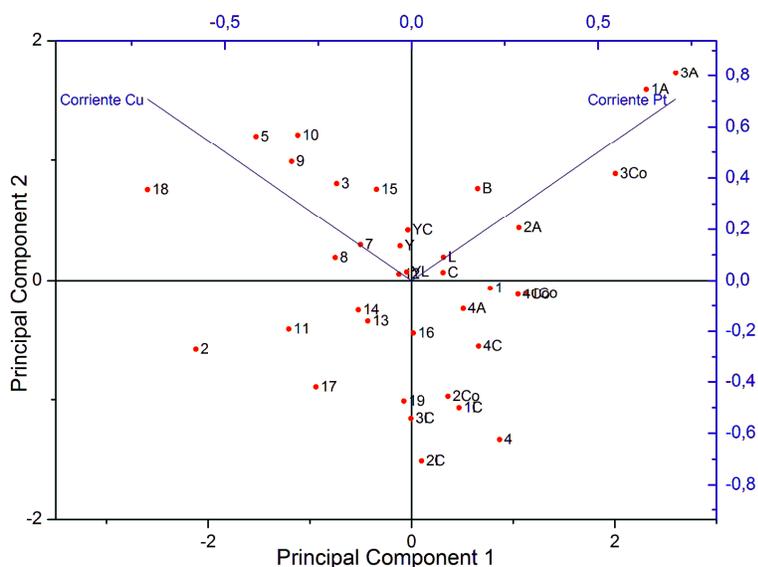
Figura 5-1. Análisis de componentes principales para los hidromieles analizados utilizando todas las variables fisicoquímicas determinadas

En la tabla 5-11 se presenta la matriz de correlación obtenida para los datos analizados, en la cual para el caso de la corriente obtenida con el sensor de cobre tiene una mayor relación con la presencia de azúcares totales y etanol. En el caso del sensor de platino, la corriente se relaciona principalmente con la presencia de sustancias antioxidantes, es decir con las determinaciones realizadas por el método de FRAP, fenoles totales y ABTS.

Tabla 5-11 Matriz de correlación para variables fisicoquímicas determinadas

Variable	ΔI sensor Cu (μA)	ΔI sensor Pt (μA)
Acidez	-0,4708	0,0062
Azúcares totales	0,7399	-0,1596
Etanol	0,3039	0,0521
Corriente Cu	1,0000	-0,1596
Corriente Pt	-0,1596	1,0000
Fenoles Totales	-0,2063	0,5171
Frap	-0,3169	0,6113
ABTS	-0,4377	0,2520

La utilización de los sensores de cobre y platino permiten la clasificación de la mayor parte de las muestras, como se observa en la figura 5-1 y como se confirma en la figura 5-2, en la cual se presenta el análisis de componentes principales sólo utilizando los valores para el cambio de corriente obtenido con los sensores. Sin embargo, es recomendable en el futuro realizar mayor número de ensayos con el fin de entrenar el sistema y permitir que la clasificación de las muestras sea posible utilizando únicamente los sensores electroquímicos. Adicionalmente, se evidencia que la señal obtenida a través del sensor de cobre tiene mayor relación con el contenido de azúcares totales, y en el caso de la señal obtenida con el electrodo de platino, se presenta mayor correlación con el contenido de fenoles totales y sustancias antioxidantes, determinadas por el método de FRAP.

**Figura 5-2. Análisis de componentes principales para los hidromieles analizados utilizando señales con el sensor de cobre y platino**

En el caso de los resultados de análisis sensorial obtenidos para los hidromieles comerciales y su relación con las señales obtenidas mediante los sensores electroquímicos de cobre y platino, se confirman los resultados anteriormente observados en la figura 5-2, como se evidencia en la figura 5-3.

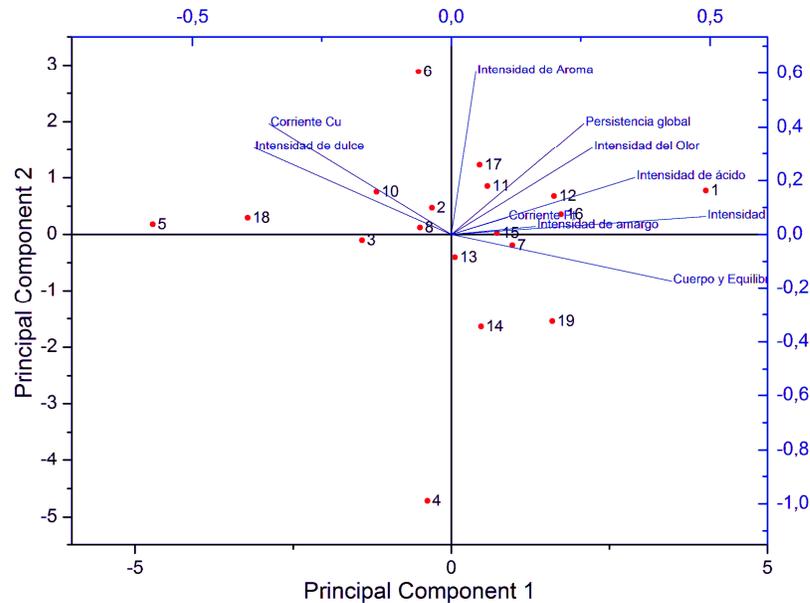


Figura 5-3. Análisis de componentes principales para hidromieles comerciales utilizando variables sensoriales determinadas y señales obtenidas mediante los sensores de cobre y platino

Adicionalmente, a través de la matriz de correlación con las variables sensoriales determinadas, la cual se presenta en la tabla 5-12, se observa que para la diferencia de corriente obtenida con el sensor de cobre hay una relación con la percepción de la intensidad de dulce y de aroma, y en el caso de la corriente obtenida con el sensor de platino, existe correlación con la intensidad del olor, alcohol, amargo y cuerpo y equilibrio. Sin embargo, así como se mencionó anteriormente, es necesario realizar más mediciones con el fin de fortalecer la posibilidad de clasificación de hidromieles utilizando el sistema de gusto artificial, debido a que los coeficientes de correlación son bastante menores que 1.

Tabla 5-12 Matriz de correlación para variables sensoriales determinadas en hidromieles comerciales

Variable	ΔI sensor Cu (μA)	ΔI sensor Pt (μA)
Corriente Cu	1	-0,00194
Corriente Pt	-0,00194	1
Intensidad del Olor	0,01321	0,37451
Intensidad de Aroma	0,47056	0,05431
Intensidad de dulce	0,78909	-0,032
Intensidad de ácido	-0,25015	0,12537
Intensidad de alcohol	-0,5957	0,22916
Intensidad de amargo	-0,17374	-0,2016
Cuerpo y Equilibrio	-0,65329	0,20779
Persistencia global	0,00639	-0,13641

6. Conclusiones y Recomendaciones

A continuación se presentarán las conclusiones y recomendaciones del trabajo realizado.

6.1 Conclusiones

- Se evidenció la aplicabilidad de sensores comerciales de oro, grafito y platino para la evaluación de sustancias presentes en la fermentación alcohólica para la obtención de hidromieles.
- La utilización de sensores de platino sin solución búfer permitió la clasificación de distintas clases de hidromieles evaluados, lo cual no ocurrió con los sensores de oro y grafito.
- Se estableció que el uso de diferentes soluciones búfer, así como de diferentes modificaciones *in situ* permiten obtener señales que se pueden relacionar con el proceso fermentativo.
- Se logró obtener respuestas para la presencia de azúcares y alcoholes a través de la modificación *in situ* con sulfato de cobre de sensores de grafito y de carbón vítreo y utilizando una solución de hidróxido de sodio como solución búfer.
- Fue posible llevar a cabo el seguimiento de las fermentaciones utilizando sensores de grafito modificados con sulfato de cobre, utilizando hidróxido de sodio como búfer, así como también sensores comerciales de platino y solución búfer de cloruro de potasio y ácido perclórico.
- Aunque se llevó a cabo la modificación para el electrodo de carbón vítreo *in situ* con nanotubos de carbono con el fin de obtener señales relacionadas con la presencia de sustancias antioxidantes, especialmente con ácido cafeico y obtener una curva de calibración, utilizando una solución búfer con fosfato y cloruro de potasio, no fue posible realizar dicha modificación para el sensor comercial de grafito debido a que el área

superficial en contacto con los nanotubos de carbono es menor, haciendo que la sensibilidad del sensor no sea igual en todos los casos.

- Fue posible realizar la evaluación de diferentes extractos de especias tales como ají, clavo y polen, utilizando los sensores de carbón vítreo modificados con nanotubos de carbono, permitiendo establecer la potencialidad de dicha modificación para la determinación de sustancias antioxidantes.
- La adición de diferentes agentes que cambian el perfil sensorial como frutas, hierbas o especias afectan el comportamiento de la fermentación a lo largo del tiempo, evidenciadas a través de las diferentes determinaciones realizadas y sus relaciones.
- Con la técnica analítica FTIR-ATR fue posible evaluar el comportamiento de diferentes fermentaciones a lo largo del tiempo; sin embargo, su correlación con la señal obtenida con el electrodo de cobre fue baja, pero con el resto de variables se evidenció una correlación alta. Esto evidencia que es posible utilizar este tipo de técnica útil en el monitoreo de procesos de fermentación alcohólica.
- A través del PTR-MS se evaluó el cambio en el perfil aromático de las fermentaciones evaluadas a lo largo del tiempo. Aunque dicha técnica no presente una alta correlación con los resultados obtenidos a través del FTIR-ATR, demostró a través de un análisis de componentes principales que las diferentes masas determinadas se relacionan con el tiempo de fermentación, brindando una herramienta adicional para el monitoreo de este tipo de procesos fermentativos.
- Los modelos lineales encontrados para las señales obtenidas mediante los sensores de cobre y platino para el caso de las fermentaciones realizadas con adición de especias, e insumos italianos y colombianos, así como aquellas fermentaciones en las que se utilizaron hierbas aromáticas, presentaron coeficientes de correlación cercanos a 0.5, pues a pesar que a través del análisis de componentes principales se evidencia que las posibles relaciones entre las variables no son tan fuertes. Sin embargo, para el caso de las fermentaciones con insumos italianos con defectos, las correlaciones encontradas para cada una de las señales evaluadas a través de un análisis de componentes principales fueron muy lejanas a 1, por lo cual no fue posible el planteamiento de modelos lineales.
- El comportamiento de las fermentaciones con frutos rojos son diferentes a las demás, debido a la presencia de fruta. Fue planteado un modelo lineal para las señales

obtenidas con el sensor de cobre, obteniendo un coeficiente de correlación por encima de 0.9, lo cual confirma que la utilización de este sensor permite llevar a cabo el seguimiento de este tipo de fermentaciones, mientras que en el caso de las señales obtenidas mediante el sensor de platino no fue posible plantear un modelo lineal, debido a que el análisis de los componentes principales demostró una baja correlación de éstas con el resto de variables determinadas.

- El uso de una nariz y una lengua electrónicas comerciales junto con las demás técnicas analíticas permitió llevar a cabo el monitoreo no sólo a nivel fisicoquímico sino relacionarlo también con los cambios sensoriales que ocurren, no sólo a nivel de sabor sino de olor, lo cual se corroboró a través del análisis de componentes principales.
- La correlación entre la señal obtenida mediante el electrodo de cobre y las demás variables obtenidas a través de un modelo lineal fue de 1, confirmando la utilidad de este tipo de técnica para el seguimiento de procesos.
- Se determinó el cambio de diferentes parámetros a lo largo del tiempo utilizando un panel sensorial con jueces entrenados y correlacionar dichas determinaciones con las encontradas a través de los sensores de cobre y platino, obteniéndose un coeficiente de correlación de 0.86 para el sensor de cobre y de 1 para el sensor de platino, lo cual reafirma la utilidad del sistema de gusto artificial desarrollado.
- Se logró el seguimiento en línea de la fermentación para observar su comportamiento a lo largo del tiempo y establecer relaciones lineales múltiples con diferentes parámetros fisicoquímicos y sensoriales.
- El sistema de gusto artificial desarrollado fue útil en la clasificación de diferentes tipos de hidromieles evaluados a pesar que la matriz de correlación obtenida después de la realización del análisis de componentes principales diera relaciones menores alrededor de 0.5 entre las demás variables fisicoquímicas y sensoriales determinadas.

6.2 Recomendaciones

- Utilizar otro tipo de sensores comerciales que permitan flexibilidad en la modificación y uso de los mismos.
- Realizar otras modificaciones químicas *in situ* que permitan mejorar la obtención de señales aplicables al proceso fermentativo.
- Evaluar diferentes condiciones del proceso de la fermentación, así como posibles perturbaciones que afecten su comportamiento
- Evaluar otro tipo de procesos mediante la utilización del dispositivo construido.
- Continuar con la aplicación de este tipo de sistema y técnicas analíticas aplicadas a diferentes tipos de procesos no sólo fermentativos sino de otro tipo.

Bibliografía

- Alcañiz, M. et al., 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), pp.122–128. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0260877412000349> [Accessed February 16, 2014].
- Arida, H., Hassan, R. & El-Naggar, A., 2012. Quality Assessment of Honey Using Modern Analytical Tools. *Analytical Letters*, 45(11), pp.1526–1536. Available at: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00032719.2012.675492> [Accessed May 7, 2013].
- Arrieta, Á. et al., 2010. Prediction of bitterness and alcoholic strength in beer using an electronic tongue. *Food Chemistry*, 123(3), pp.642–646.
- Balasubramanian, K. & Burghard, M., 2006. Biosensors based on carbon nanotubes. *Analytical and bioanalytical chemistry*, pp.452–468. Available at: <http://link.springer.com/article/10.1007/s00216-006-0314-8> [Accessed May 7, 2013].
- Bardy, J. et al., 2008. A systematic review of honey uses and its potential value within oncology care. *Journal of clinical nursing*, 17(19), pp.2604–23. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18808626> [Accessed March 18, 2012].
- Barrios, C. & Principal, J., 2010. Caracterización físico-química y análisis sensorial de un Hidromiel elaborado de manera artesanal. *Zootecnia Trop*, 28(3), pp.313–319.
- Berry, B., 2009. *The Global Mead Market: Opportunities for Canadian Mead Exporters*, Available at: <http://www.ats.agr.gc.ca/inter/4347-eng.pdf>.
- Beullens, K. et al., 2006. The electronic tongue and ATR–FTIR for rapid detection of sugars and acids in tomatoes. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 116(1-2), pp.107–115.
- Biasioli, F. et al., 2011. PTR-MS monitoring of VOCs and BVOCs in food science and technology. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 30(7), pp.968–977. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165993611001233> [Accessed January 22, 2014].
- Blanco, A., 2012. *Evaluacion de algunas fuentes de nitrógeno en la fermentacion alcohólica de miel*. Universidad Nacional de Colombia.

- Bleibaum, R., 2002. Comparison of sensory and consumer results with electronic nose and tongue sensors for apple juices. *Food Quality and Preference*, 13(6), pp.409–422. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0950329302000174>.
- Bogdanov, S., 2009. Honey Composition. In *Book of Honey, Chapter 5*. Bee Product Science, pp. 1–13. Available at: www.bee-hexagon.net.
- Bratov, A., Abramova, N. & Ipatov, A., 2010. Analytica Chimica Acta Recent trends in potentiometric sensor arrays — A review. *Analytica Chimica Acta*, 678(2), pp.149–159. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2010.08.035>.
- Brett, C. & Brett, A., 1993. *Electrochemistry: principles, methods, and applications*, Oxford: Oxford University Press. Available at: <http://library.wur.nl/WebQuery/clc/587639> [Accessed July 2, 2014].
- Buratti, S. et al., 2011. Monitoring of alcoholic fermentation using near infrared and mid infrared spectroscopies combined with electronic nose and electronic tongue. *Analytica chimica acta*, 697(1-2), pp.67–74.
- Buratti, S. et al., 2007. Prediction of Italian red wine sensorial descriptors from electronic nose, electronic tongue and spectrophotometric measurements by means of Genetic Algorithm regression models. *Food Chemistry*, 100(1), pp.211–218.
- Campos, I. et al., 2012. A method of pulse array design for voltammetric electronic tongues. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 161(1), pp.556–563. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0925400511009804> [Accessed February 16, 2014].
- Cetó, X., Céspedes, F., Pividori, M.I., et al., 2012. Resolution of phenolic antioxidant mixtures employing a voltammetric bio-electronic tongue. *The Analyst*, 137(2), pp.349–56. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22102984> [Accessed February 6, 2014].
- Cetó, X. et al., 2011. Voltammetric Electronic Tongue in the Analysis of Cava Wines. *Electroanalysis*, 23(1), pp.72–78.
- Cetó, X., Céspedes, F. & Valle, M., 2013. Comparison of methods for the processing of voltammetric electronic tongues data. *Microchimica Acta*, 180(5-6), pp.319–330. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s00604-012-0938-7> [Accessed February 16, 2014].
- Cetó, X., Céspedes, F. & del Valle, M., 2012. BioElectronic Tongue for the quantification of total polyphenol content in wine. *Talanta*, 99, pp.544–51. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22967592> [Accessed February 16, 2014].
- Chen, C.-H. et al., 2013. Physicochemical property changes during the fermentation of longan (*Dimocarpus longan*) mead and its aroma composition using multiple yeast

- inoculations. *Journal of the Institute of Brewing*, 119(4), pp.303–308. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/jib.95> [Accessed January 23, 2014].
- Colombié, S., Latrille, E. & Sablayrolles, J.-M., 2007. Online estimation of assimilable nitrogen by electrical conductivity measurement during alcoholic fermentation in enological conditions. *Journal of bioscience and bioengineering*, 103(3), pp.229–35. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17434425> [Accessed January 30, 2013].
- Cuenca, M. & Díaz, M., 2003. *Instalacion y puesta en marcha de un biorreactor a nivel piloto para la produccion continua de etanol utilizando células inmovilizadas*. Colombia: Universidad Nacional de Colombia.
- Daniel, S. & Schramm, K.D., 1995. *Mead Success: Ingredients, Processes and Techniques*. Zmuyrgy Spring 1995, pp.33–39.
- Daniele, S. et al., 1998. Voltammetry for reduction of hydrogen ions from mixtures of mono- and polyprotic acids at platinum microelectrodes. *Analytical Chemistry*, 70(2), pp.285–294. Available at: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac970666k> [Accessed September 26, 2013].
- Dayton, M. a. et al., 1980. Faradaic electrochemistry at microvoltammetric electrodes. *Analytical Chemistry*, 52(6), pp.946–950. Available at: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac50056a040>.
- Deisingh, A., 2004. Applications of electronic noses and tongues in food analysis. *International journal of ...*, pp.587–604. Available at: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2621.2004.00821.x/full> [Accessed November 22, 2014].
- Dias, L. a. et al., 2008. An electronic tongue for honey classification. *Microchimica Acta*, 163(1-2), pp.97–102. Available at: <http://www.springerlink.com/index/10.1007/s00604-007-0923-8> [Accessed May 12, 2012].
- Esbensen, K. et al., 2004. Fermentation monitoring using multisensor systems: feasibility study of the electronic tongue. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 378(2), pp.391–5.
- Escríche, I. et al., 2012. A potentiometric electronic tongue for the discrimination of honey according to the botanical origin. Comparison with traditional methodologies: Physicochemical parameters and volatile profile. *Journal of Food Engineering*, 109(3), pp.449–456. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0260877411006017> [Accessed February 16, 2014].
- Espinal, C.F., Martínez, H. & Nieto, C.M., 2006. *La cadena de las abejas y la apicultura en Colombia*,

- FAO, 2012. Faostat. *Estadísticas mundiales de producción, comercio y mercado*. Available at: <http://faostat.fao.org/default.aspx?alias=faostat&lang=es> [Accessed April 1, 2012].
- Fattori, S.B., 2004. *La Miel*, Buenos Aires: Universidad de Buenos Aires.
- Gallardo-Velázquez, T. et al., 2009. Application of FTIR-HATR spectroscopy and multivariate analysis to the quantification of adulterants in Mexican honeys. *Food Research International*, 42(3), pp.313–318. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996908002366> [Accessed June 25, 2013].
- Garcia, M., Quicazan, M. & Blanco, A., 2014. Estudio de inteligencia competitiva de hidromiel en Colombia.
- Gay, M. et al., 2010. Application of an electronic tongue to study the effect of the use of pieces of wood and micro-oxygenation in the aging of red wine. *Electrochimica Acta*, 55(22), pp.6782–6788.
- Gil-Sánchez, L. et al., 2011. A novel humid electronic nose combined with an electronic tongue for assessing deterioration of wine. *Sensors and Actuators A: Physical*, 171, pp.152–158.
- Gomes, T. et al., 2013. Optimization of mead production using Response Surface Methodology. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 59, pp.680–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23856495> [Accessed January 26, 2014].
- Gutiérrez, J.M. et al., 2010. A voltammetric electronic tongue made of modified epoxy-graphite electrodes for the qualitative analysis of wine. *Microchimica Acta*, 169(3-4), pp.261–268.
- Gutiérrez, M., Llobera, A., et al., 2011. Application of an e-tongue to the analysis of monovarietal and blends of white wines. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 11(5), pp.4840–57. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3231368&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed September 11, 2012].
- Gutiérrez, M. et al., 2010. Hybrid electronic tongue based on optical and electrochemical microsensors for quality control of wine. *The Analyst*, 135(7), pp.1718–25. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20445923> [Accessed March 6, 2012].
- Gutiérrez, M., Domingo, C., et al., 2011. Hybrid electronic tongue for the characterization and quantification of grape variety in red wines. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 156(2), pp.695–702. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0925400511001316> [Accessed March 24, 2011].

- HelmholtzZentrum, M., 2014. AMSD Research Unit Medical Radiation Physics and Diagnostics Breath gas analysis by PTR-MS Proton-Transfer-Reaction-Mass-Spectrometry (PTR-MS). , pp.1–3. Available at: <http://www.helmholtz-muenchen.de/amsd/research/groups/biokinetics-and-radiation-driven-molecular-medicine/breath-gas-analysis-by-ptr-ms/measurement-technology/index.html> [Accessed June 19, 2014].
- Hruškar, M., Major, N. & Krpan, M., 2009. Evaluation of milk and dairy products by electronic tongue. *Mljekarstvo*, 59(3), pp.193–200. Available at: http://hrcak.srce.hr/index.php?show=clanak&id_clanak_jezik=63540 [Accessed May 7, 2014].
- Kahoun, D., Rezková, S., et al., 2008. Determination of phenolic compounds and hydroxymethylfurfural in meads using high performance liquid chromatography with coulometric-array and UV detection. *Journal of chromatography. A*, 1202(1), pp.19–33.
- Kahoun, D., Rezková, S. & Veškrnová, K., 2008. Determination of phenolic compounds and hydroxymethylfurfural in meads using high performance liquid chromatography with coulometric-array and UV detection. ... of *Chromatography A*, 1202, pp.19–33. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967308010443> [Accessed August 12, 2013].
- Kántor, Z., Pitsi, G. & Thoen, J., 1999. Glass transition temperature of honey as a function of water content as determined by differential scanning calorimetry. *Journal of agricultural and food chemistry*, 47(6), pp.2327–30.
- Kilmartin, P. a. & Zou, H., 2001. The Effect of Electrode Material on the Measured Redox Potential of Red and White Wines. *Electroanalysis*, 13(16), pp.1347–1350. Available at: [http://doi.wiley.com/10.1002/1521-4109\(200111\)13:16<1347::AID-ELAN1347>3.0.CO;2-I](http://doi.wiley.com/10.1002/1521-4109(200111)13:16<1347::AID-ELAN1347>3.0.CO;2-I).
- Kollmannsberger, H. & Nitz, S., 2007. Advanced Instrumental Analysis and Electronic Noses. *Flavours and fragrances*.
- Krantz-Rülcker, C., 2001. Electronic tongues for environmental monitoring based on sensor arrays and pattern recognition: a review. *Analytica Chimica Acta*, 426(2), pp.217–226.
- Kumar, K., 2006. Design of a discriminating taste sensor using mutual information. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 119(1), pp.215–219. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0925400505009627> [Accessed March 24, 2011].
- Lamberti, N. et al., 2009. An ultrasound technique for monitoring the alcoholic wine fermentation. *Ultrasonics*, 49(1), pp.94–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18635244> [Accessed February 19, 2013].

- Laureati, M. et al., 2010. Discrimination and characterisation of three cultivars of *Perilla frutescens* by means of sensory descriptors and electronic nose and tongue analysis. *Food Research International*, 43(4), pp.959–964.
- Laverde, J.C. et al., 2010. *Agenda prospectiva de investigacion y desarrollo tecnológico para la cadena productiva de las abejas y la apicultura en Colombia con énfasis en miel de abejas*, Bogota.
- Lavigne, J.J. et al., 1998. Solution-Based Analysis of Multiple Analytes by a Sensor Array: Toward the Development of an “Electronic Tongue.” *Journal of the American Chemical Society*, 120(25), pp.6429–6430.
- Legin, A., 2000. Application of electronic tongue for qualitative and quantitative analysis of complex liquid media. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 65(1-3), pp.232–234.
- Li, F., Scampicchio, M. & Mannino, S., 2011. Carbon Nanotube-Adsorbed Electrospun Nanofibrous Membranes as Coating for Electrochemical Sensors for Sulfhydryl Compounds. *Electroanalysis*, 23(8), pp.1773–1775. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/elan.201100068> [Accessed May 3, 2013].
- Lindinger, C. et al., 2005. Unambiguous identification of volatile organic compounds by proton-transfer reaction mass spectrometry coupled with GC/MS. *Analytical chemistry*, 77(13), pp.4117–24. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15987117>.
- Lindinger, W., Hansel, a. & Jordan, a., 1998. On-line monitoring of volatile organic compounds at pptv levels by means of proton-transfer-reaction mass spectrometry (PTR-MS) medical applications, food control and environmental research. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*, 173(3), pp.191–241. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168117697002814>.
- Luykx, D.M. a. M. & van Ruth, S.M., 2008. An overview of analytical methods for determining the geographical origin of food products. *Food Chemistry*, 107(2), pp.897–911. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814607009533> [Accessed June 21, 2013].
- Lvova, L., Paolesse, R., et al., 2006. Detection of alcohols in beverages: An application of porphyrin-based Electronic tongue. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 118(1-2), pp.439–447.
- Lvova, L., Martinelli, E., et al., 2006. Electronic tongue based on an array of metallic potentiometric sensors. *Talanta*, 70(4), pp.833–9.
- MAAREC, 2004. HONEY. Available at: <http://maarec.cas.psu.edu> [Accessed March 27, 2012].
- Main, B., 2012. History of Mead. *Online*, pp.1–3. Available at: <http://www.beer100.com/history/meadhistory.htm>.

- Marioli, J.M. & Kuwana, T., 1992. Electrochemical characterization of carbohydrate oxidation at copper electrodes. *Electrochimica Acta*, 37(7), pp.1187–1197. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/001346869285055P>.
- McConnell, D.S. et al., 2012. An Analysis of Mead , Mead Making and the Role of its Primary Constituents. , pp.1–14.
- McConnell, D.S. & Schramm, K.D., 2012. An Analysis of Mead, Mead Making and the Role of its Primary Constituents. *Home Brew Digest, Incorporated*. Available at: <http://hbd.org/brewery/library/Meadx.html> [Accessed March 3, 2012].
- McInerney, R.J., 1990. Honey--a remedy rediscovered. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 83(2), p.127.
- Mendes-Ferreira, a et al., 2010. Optimization of honey-must preparation and alcoholic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* for mead production. *International journal of food microbiology*, 144(1), pp.193–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20937538> [Accessed April 29, 2012].
- Mendes-ferreira, A. et al., 2010. Optimization of honey-must preparation and alcoholic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* for mead production. *International Journal of Food Microbiology*, 144(1), pp.193–198. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.09.016>.
- Menezes, C. et al., 2013. Chapter 10 The Role of Useful Microorganisms to Stingless Bees and Stingless Beekeeping. In P. Vit, S. R. M. Pedro, & D. Roubik, eds. *Pot-Honey*. New York, NY: Springer New York, pp. 153–171. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-4614-4960-7> [Accessed January 23, 2014].
- Mia, P., 2010. Raw honey uses. *Health (San Francisco)*, pp.1–3.
- Moreno i Codinachs, L. et al., 2008. Electronic integrated multisensor tongue applied to grape juice and wine analysis. *The Analyst*, 133(10), pp.1440–8.
- Di Natale, C. et al., 2000. Electronic nose and electronic tongue integration for improved classification of clinical and food samples. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 64(1-3), pp.15–21.
- Di Natale, C. et al., 1997. Multicomponent analysis on polluted waters by means of an electronic tongue. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 44(1-3), pp.423–428.
- Navrátil, M., Šturdík, E. & Gemeiner, P., 2001. Batch and continuous mead production with pectate immobilised , ethanol-tolerant yeast. *Biote*, 23, pp.977–982.
- Navrátil, M., Šturdík, E. & Gemeiner, P., 2001. Batch and continuous mead production with pectate immobilised, ethanol-tolerant yeast. *Biotechnology letters*, 23(12), pp.977–982.

- Novakowski, W., Bertotti, M. & Paixão, T.R.L.C., 2011. Use of copper and gold electrodes as sensitive elements for fabrication of an electronic tongue: Discrimination of wines and whiskies. *Microchemical Journal*, 99(1), pp.145–151.
- Oliveri, P., Casolino, M.C. & Forina, M., 2010. Chapter 2. Chemometric brains for artificial tongues. In *Advances in food and nutrition research*. Elsevier Inc., pp. 57–117.
- Ouyang, Q., Zhao, J. & Chen, Q., 2013. Classification of rice wine according to different marked ages using a portable multi-electrode electronic tongue coupled with multivariate analysis. *Food Research International*, 51(2), pp.633–640. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996912005558> [Accessed February 16, 2014].
- Parra, V., Arrieta, Á. a., Fernández-Escudero, J.-A., et al., 2006. Electronic tongue based on chemically modified electrodes and voltammetry for the detection of adulterations in wines. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 118(1-2), pp.448–453. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0925400506003303> [Accessed May 12, 2012].
- Parra, V., Arrieta, Á. a., Fernández-Escudero, J. a., et al., 2006. Monitoring of the ageing of red wines in oak barrels by means of an hybrid electronic tongue. *Analytica Chimica Acta*, 563(1-2), pp.229–237. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S000326700501603X> [Accessed May 12, 2012].
- Pereira, A.P. et al., 2014. Effect of *Saccharomyces cerevisiae* cells immobilisation on mead production. *LWT - Food Science and Technology*, 56(1), pp.21–30. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643813004088> [Accessed February 8, 2014].
- Pereira, A.P. et al., 2009. Mead production: selection and characterization assays of *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 47(8), pp.2057–63.
- PerkinElmer, 2005. *FT-IR Spectroscopy Total Reflectance (ATR)-Technical Note*,
- Photinon, K. et al., 2010. A thick-film sensor as a novel device for determination of polyphenols and their antioxidant capacity in white wine. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 10(3), pp.1670–8. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3264445&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed February 22, 2013].
- Pigani, L. et al., 2011. Pedot modified electrodes in amperometric sensing for analysis of red wine samples. *Food Chemistry*, 129(1), pp.226–233.

- Pioggia, G., Di Francesco, F., Marchetti, A., Ferro, M. & Ahluwalia, A., 2007. A composite sensor array impedentiometric electronic tongue Part I. Characterization. *Biosensors & bioelectronics*, 22(11), pp.2618–23.
- Pioggia, G., Di Francesco, F., Marchetti, A., Ferro, M., Leardi, R., et al., 2007. A composite sensor array impedentiometric electronic tongue Part II. Discrimination of basic tastes. *Biosensors & bioelectronics*, 22(11), pp.2624–8.
- Prien, R., 2007. The future of chemical in situ sensors. *Marine Chemistry*, 107(3), pp.422–432.
- Prieto, N. et al., 2011. Analysis of the influence of the type of closure in the organoleptic characteristics of a red wine by using an electronic panel. *Food Chemistry*, 129(2), pp.589–594.
- Qureshi, N., 1986. Mead production by continuous series reactors using immobilized yeast cells. *Applied microbiology and biotechnology*, 23, pp.438–439.
- Qureshi, N. & Tamhane, D., 1986. Mead production by continuous series reactors using immobilized yeast cells. *Applied microbiology and biotechnology*, 23(6), pp.438–439.
- Qureshi, N. & Tamhane, D., 1987. Production of mead by immobilized cells of *Hansenula anomala*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 27, pp.27–30.
- Qureshi, N. & Tamhane, D. V, 1987. Applied Microbiology Biotechnology Production of mead by immobilized cells of *Hansenula anomala*. , pp.27–30.
- Qureshi, N. & Tamhane, D. V, 1985. Production of mead by immobilized whole cells of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering*, pp.280–281.
- Rachid, O. et al., 2010. An electronic tongue: evaluation of the masking efficacy of sweetening and/or flavoring agents on the bitter taste of epinephrine. *AAPS PharmSciTech*, 11(2), pp.550–7.
- Ramalhosa, E. et al., 2011. *Mead production tradition versus modernity* 1st ed., Elsevier Inc.
- Roldán, A. et al., 2011a. Influence of pollen addition on mead elaboration: Physicochemical and sensory characteristics. *Food Chemistry*, 126(2), pp.574–582. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814610014639> [Accessed August 12, 2013].
- Roldán, A. et al., 2011b. Influence of pollen addition on mead elaboration: Physicochemical and sensory characteristics. *Food Chemistry*, 126(2), pp.574–582.
- Rong, L., 2000. A novel method for wine analysis based on sensor fusion technique. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 66(1-3), pp.246–250.

- Rudnitskaya, A. et al., 2006. Analysis of apples varieties – comparison of electronic tongue with different analytical techniques. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 116(1-2), pp.23–28.
- Rudnitskaya, A. et al., 2010. Instrumental measurement of bitter taste in red wine using an electronic tongue. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 397(7), pp.3051–60. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20549490> [Accessed March 23, 2012].
- Rudnitskaya, A. et al., 2007. Prediction of the Port wine age using an electronic tongue. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 88(1), pp.125–131.
- Rudnitskaya, A. et al., 2009. Study of the influence of micro-oxygenation and oak chip maceration on wine composition using an electronic tongue and chemical analysis. *Analytica chimica acta*, 642(1-2), pp.235–45.
- Rudnitskaya, A. & Legin, A., 2008a. Sensor systems, electronic tongues and electronic noses, for the monitoring of biotechnological processes. *Journal of industrial microbiology and biotechnology*, 35, pp.443–451.
- Rudnitskaya, A. & Legin, A., 2008b. Sensor systems, electronic tongues and electronic noses, for the monitoring of biotechnological processes. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 35(5), pp.443–51.
- Sablaylorles, J.M., 2009. Control of alcoholic fermentation in winemaking: Current situation and prospect. *Food Research International*, 42(4), pp.418–424. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996908002524> [Accessed February 19, 2013].
- Scampicchio, M. et al., 2008. Amperometric electronic tongue for food analysis. *Microchimica Acta*, 163(1), pp.11–21.
- Schmidtke, L.M. et al., 2010. Sensory, chemical, and electronic tongue assessment of micro-oxygenated wines and oak chip maceration: assessing the commonality of analytical techniques. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(8), pp.5026–33.
- Söderström, C. et al., 2005. Differentiation of four *Aspergillus* species and one *Zygosaccharomyces* with two electronic tongues based on different measurement techniques. *Journal of biotechnology*, 119(3), pp.300–8.
- Spitaler, R. et al., 2007. PTR-MS in enology: Advances in analytics and data analysis. *International Journal of Mass Spectrometry*, 266(1-3), pp.1–7. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1387380607002266> [Accessed June 27, 2013].
- Sroka, P. et al., 2013. IMMOBILIZATION OF YEAST ON GRAPES FOR MEAD. *Potravinárstvo*, 7(March), pp.226–230.

- Sroka, P. & Tuszyński, T., 2007a. Changes in organic acid contents during mead wort fermentation. *Food Chemistry*, 104(3), pp.1250–1257. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814607001392> [Accessed February 16, 2013].
- Sroka, P. & Tuszyński, T., 2007b. Changes in organic acid contents during mead wort fermentation. *Food Chemistry*, 104(3), pp.1250–1257.
- Suzuki, D., 2008. Smart Taste Sensors. *Analytical chemistry*, pp.3965–3972.
- The New York Times, 2012. So Old It 's New, Mead Enjoys a Renaissance. *Dining & Wine*, pp.1–5. Available at: <http://www.nytimes.com/2012/02/08/dining/mead-enjoys-a-renaissance.html?scp=1&sq=Dining & Wine mead&st=cse>.
- Tiwari, K. et al., 2013. Identification of monofloral honey using voltammetric electronic tongue. *Journal of Food Engineering*, 117(2), pp.205–210. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0260877413001052> [Accessed February 16, 2014].
- Tiwari, K. & Tudu, B., 2012. Discrimination of monofloral honey using cyclic voltammetry. *Emerging Trends and ...*, (1c). Available at: http://ieeexplore.ieee.org/xpls/abs_all.jsp?arnumber=6203312 [Accessed February 28, 2013].
- Toko, K., 1998. A taste sensor. *Measurement Science and Technology*, pp.1919–1938.
- Toko, K., 2004. *Measurement of taste and smell using biomimetic sensor*, Piscataway, NJ: IEEE.
- Toko, K., 2000. Taste sensor. *Sensors And Actuators*, pp.205–215.
- Torricella, R. & Huerta, V., 2008. *Análisis Sensorial Análisis Sensorial aplicado a la restauración* 2008th ed. M. de E. superior de la R. de C. Instituto Culinario de México, ed., La Habana, Cuba.
- Torricella, R., Zamora, E. & Pulido, H., 2007. *Evaluacion sensorial: aplicada a la investigacion desarrollo y control de la calidad en la industria alimentaria* Second Edi. E. Universitaria, ed., La Habana, Cuba: Instituto de Investigaciones para la Industria Alimenticia.
- Ugliano, M. & Henschke, P.A., 2009. *Wine Chemistry and Biochemistry* M. V. Moreno-Arribas & M. C. Polo, eds., New York, NY: Springer New York. Available at: <http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-0-387-74118-5> [Accessed March 27, 2012].

- Del Valle, M., 2012. Sensor Arrays and Electronic Tongue Systems. *International Journal of Electrochemistry*, 2012, pp.1–11. Available at: <http://www.hindawi.com/journals/ijelc/2012/986025/> [Accessed February 16, 2014].
- Vidrih, R. & Hribar, J., 2007. Studies on the sensory properties of mead and the formation of aroma compounds related to the type of honey. *Acta Alimentaria*, 36(2), pp.151–162. Available at: <http://www.akademai.com/openurl.asp?genre=article&id=doi:10.1556/AAlim.36.2007.2.2> [Accessed May 12, 2012].
- Viswanathan, S., Radecka, H. & Radecki, J., 2009. Electrochemical biosensors for food analysis. *Monatshefte für Chemie - Chemical Monthly*, 140(8), pp.891–899.
- Vlasov, Y., 2000. «Electronic tongue» — new analytical tool for liquid analysis on the basis of non-specific sensors and methods of pattern recognition. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 65(1-3), pp.235–236.
- Vlasov, Y., Legin, A. & Rudnitskaya, A., 2008. Electronic tongue: chemical sensor systems for analysis of aquatic media. *Russian Journal of General Chemistry*, 78(12), pp.2532–2544. Available at: <http://www.springerlink.com/index/666MT761J671HU38.pdf> [Accessed May 17, 2012].
- Wang, J., 2000. *ANALYTICAL ELECTROCHEMISTRY* Second Edi. Wiley-VCH, ed., New York, NY.
- Wang, J., 2005. Carbon-Nanotube Based Electrochemical Biosensors: A Review. *Electroanalysis*, 17(1), pp.7–14. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/elan.200403113> [Accessed July 15, 2012].
- Wang, J. & Rogers, K., 1995. *Electrochemical sensors for environmental monitoring: A review of recent technology*, Available at: http://clu-in.org/download/char/sensr_ec.pdf [Accessed February 19, 2013].
- Wei, Z., Wang, J. & Ye, L., 2011. Classification and prediction of rice wines with different marked ages by using a voltammetric electronic tongue. *Biosensors & bioelectronics*, 26(12), pp.4767–73. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21683570> [Accessed March 4, 2012].
- White, J., 1980. Honey composition and properties. *Beekeeping in the United States*, pp.82–91.
- White, J., 1975. Physical characteristics of honey. *Honey: A comprehensive survey*.
- Wilson, A.D., 2013. Diverse applications of electronic-nose technologies in agriculture and forestry. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 13(2), pp.2295–348. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3649433&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed September 16, 2014].

- Wilson, A.D. & Baietto, M., 2009. Applications and Advances in Electronic-Nose Technologies. *Sensors*, 9(7), pp.5099–5148.
- Winqvist, F. et al., 2000. A hybrid electronic tongue. *Analytica Chimica Acta*, 406(2), pp.147–157.
- Winqvist, F., 1999. The combination of an electronic tongue and an electronic nose. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 58(1-3), pp.512–517.
- Winqvist, F., Wide, P. & Lundström, I., 1997. An electronic tongue based on voltammetry. *Analytica Chimica Acta*, 357(1-2), pp.21–31.
- Wintersteen, C., Andrae, L. & Engeseth, N., 2005. Effect of heat treatment on antioxidant capacity and flavor volatiles of mead. *Journal of Food Chemistry*, 20(2), pp.c119–c126.
- Wintersteen, C.L., Andrae, L.M. & Engeseth, N.J., 2005. Effect of heat treatment on antioxidant capacity and flavor volatiles of mead. *Journal of food science*, 70(2), pp.C119–C126.
- Xu, S. et al., 2014. Improved algorithms for the classification of rough rice using a bionic electronic nose based on PCA and the Wilks distribution. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 14(3), pp.5486–501. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4004003&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed June 20, 2014].
- Yakovleva, K.E. et al., 2007. Characterization of plant phenolic compounds by cyclic voltammetry. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 43(6), pp.661–668. Available at: <http://link.springer.com/10.1134/S0003683807060166> [Accessed May 7, 2013].
- Zeravik, J., Hlavacek, A. & Lacina, K., 2009. State of the Art in the Field of Electronic and Bioelectronic Tongues – Towards the Analysis of Wines. *Electroanalysis*.
- Zhou, J. et al., 2010. Research on Pattern Recognition Based on the Universal Electronic Tongue System. In *Wireless Communications Networking and Mobile Computing (WiCOM), 2010 6th International Conference on*. IEEE, pp. 1–4.

A. Anexo: Información acerca de la miel

Cuando la miel se extrae del panal, es una dispersión acuosa de material con partículas cuyo tamaño varía en un amplio rango, desde iones inorgánicos, azúcares y otros materiales orgánicos en solución hasta macromoléculas de proteínas y polisacáridos en dispersión coloidal; la miel puede contener esporas de hongos y levaduras, granos de polen y una gran cantidad de partículas (Fattori 2004). Las abejas utilizan la miel como fuente de energía, y cuando el apicultor hace la recolección, su vida útil es alta debido a la alta concentración de azúcares y bajo contenido de humedad.

El néctar proveniente de las flores, principal materia prima para la elaboración de la miel, está compuesta por carbohidratos principalmente, tales como: sacarosa, fructosa, glucosa. En general, la composición del néctar es muy variada y depende fundamentalmente de su origen. (Fattori 2004). Se puede afirmar que existen néctares constituidos mayoritariamente por sacarosa, con bajas concentraciones de fructosa y glucosa (20% y 5% respectivamente), mientras que otros, por ejemplo, el de canola, poseen vestigios de sacarosa y cantidades aproximadamente iguales de glucosa y fructosa (50% y 45% respectivamente) (Fattori 2004). Existen también néctares que poseen cantidades aproximadamente iguales de los tres azúcares.

Adicionalmente, el néctar puede tener otros componentes menores tales como: almidón, gomas, taninos, sustancias minerales y ácidos oxálico, málico y tartárico. El contenido de nitrógeno y de vitaminas es bajo y su pH es ligeramente alcalino. Las sustancias minerales son asimiladas parcialmente por la abeja durante la elaboración de la miel, el almidón se convierte en dextrinas y los taninos son responsables del sabor astringente, ya que se oxidan parcialmente (Fattori 2004).

Cuando hay escasez de néctar, la abeja busca alimento en otras fuentes de azúcar y frecuentemente recoge mielada, producida por ciertos hemípteros pertenecientes al orden *Rhynchotha*, capaces de perforar los tejidos vegetales y aspirar savia. La composición de la mielada es diferente a la de la savia porque el insecto produce modificaciones físicoquímicas, por la acción de enzimas. La mielada puede llegar a contener hasta 50% de sacarosa y otros disacáridos, el 50% restante está conformado por glucosa y fructosa en relación 1:2. Algunos de los insectos productores de mielada son: cochinilla, mosca blanca, cigarra y pulgón. (Fattori 2004).

Por lo tanto, la miel de abejas puede clasificarse en: miel de flores, la cual se obtiene a partir del néctar de flores y miel de mielada, obtenida principalmente a partir de las secreciones de partes vivas de plantas o de insectos succionadores presente en ellas.

1. Proceso de Extracción

En la Figura A-1 se presenta el proceso de extracción de la miel, el cual inicia con la remoción de los opérculos o tapones de cera, con los cuales las abejas cierran las celdas del panal una vez que la miel está madura. Posteriormente, la miel es separada del panal generalmente mediante centrifugación; puede también utilizarse el escurrido de los panales, el cual requiere mucho tiempo para su obtención y permite intercambio de humedad con el ambiente; la trituración y prensado de los panales no es muy usada, ya que se afecta el sabor de la miel (polen y cera). Después de ser separada, la miel pasa a un proceso de filtrado para eliminar los fragmentos de cera, abejas y otras impurezas; esta operación también retarda la cristalización porque retiene cristales grandes de glucosa, partículas de polen, burbujas de aire y otras partículas que pueden actuar como núcleos de cristalización (White 1980). Pasa luego a una etapa de reposo o decantación, en la cual se eliminan cuerpos extraños, partículas de cera, burbujas, entre otros. Finalmente, se lleva a cabo la pasteurización, la cual permite controlar la cristalización porque evita la formación de núcleos de cristalización y destruye parcialmente las levaduras presentes; este calentamiento debe realizarse lo más rápidamente posible y una vez alcanzado el tiempo de proceso debe enfriarse inmediatamente (White 1980) y debe utilizarse equipos especialmente diseñados para la pasteurización de miel.

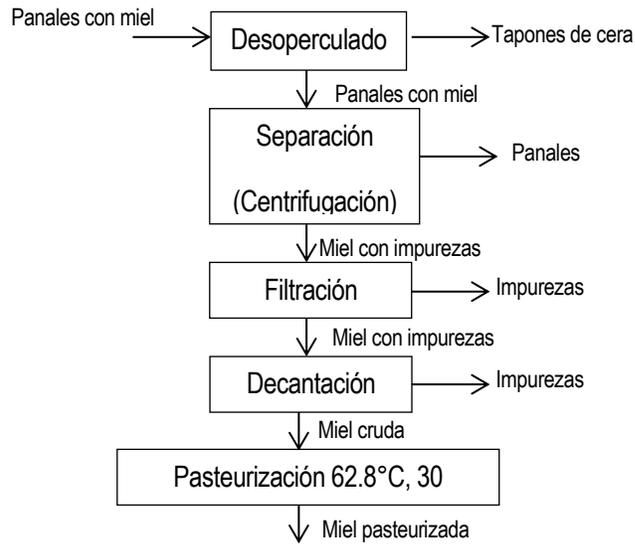


Figura A-1. Diagrama de proceso de extracción de miel

2. Clasificación

La clasificación de miel actualmente vigente está establecida por la Resolución MERCOSUR 15/94, en ella se diferencian las mieles de acuerdo con el procedimiento de obtención, la forma de presentación y su destino. En las tablas A-1, A-2 y A-3 se presentan diferentes clasificaciones de acuerdo con su proceso de obtención, forma y destino, respectivamente.

Tabla A-1. Clasificación de mieles según su proceso de obtención

Tipo de miel	Característica
Miel escurrida	Obtenida por escurrimiento de los panales desoperculados y sin larvas
Miel prensada	Obtenida por prensado de los panales sin larvas
Miel centrifugada	Obtenida por centrifugación de los panales desoperculados y sin larvas
Miel filtrada	Sometida a un proceso de filtración sin alterar su valor nutritivo

Tabla A-2. Clasificación de mieles según su forma

Tipo de miel	Característica
Miel	En estado líquido, cristalizado o una mezcla de ambas
Miel en panales Miel en secciones	Almacenada por las abejas en celdas operculadas de panales nuevos, contruidos por ellas mismas que no contengan larvas y comercializada en panal entero o secciones de tales panales
Miel con trozos de panal	Contiene uno o más trozos de panales con miel, exentos de larvas.
Miel cristalizada o granulada	Ha experimentado un proceso natural de solidificación como consecuencia de la cristalización de la glucosa
Miel cremosa	Tiene una estructura cristalina fina y que puede haber sido sometida a un proceso físico que le confiera esa estructura y que la haga fácil de untar. El proceso de cristalización es provocado y controlado.

Tabla A-3. Clasificación de mieles según su destino

Tipo de miel	Característica
Miel para consumo directo	Responde a las características físico-químicas establecidas por la Resolución MERCOSUR 15/94
Miel para utilización en la industria (miel para uso industrial)	Responde a las características físico-químicas establecidas por la Resolución MERCOSUR 15/94, excepto el índice de diastasa y el contenido de hidroximetilfurfural que podrán ser menor de 8 (en la escala de Gothe) y mayor de 40 meq/kg hasta un máximo de 80 meq/kg, respectivamente.

3. Características

La composición, color y aroma de la miel dependen de las flores cuyo néctar succionaron las abejas; también influyen factores como la naturaleza del suelo, el manejo apícola y la temperatura de almacenamiento, pues afecta no sólo las características organolépticas sino su conservación frente a posibles fermentaciones no deseables. Recién cosechada, se recomienda una temperatura de almacenamiento menor a 10°C, y procesada, entre 18 y 24°C (Fattori 2004). El origen botánico de las mieles define también la mayor o menor facilidad de éstas a cristalizar.

3.1 Composición

En cuanto a su composición, la miel es una solución sobresaturada de azúcares, que constituyen alrededor del 80-90% del total; donde los monosacáridos fructosa y glucosa,

resultan ser los azúcares predominantes en la mayoría de las mieles, mientras que el contenido de disacáridos, como la sacarosa y maltosa se encuentra alrededor del 5-10% p/p, reconociéndose además carbohidratos como turanosa, isomaltosa, maltulosa y maltosa. (White 1980)

El pH promedio de la miel es de 3,9, pero puede variar desde 3,4 hasta 6,1. La miel contiene muchos tipos de ácidos, tanto orgánicos y amino. Sin embargo, los diferentes tipos y sus cantidades varían considerablemente, dependiendo del tipo de miel. Estos ácidos pueden ser aromáticos o alifáticos. Los ácidos alifáticos contribuyen en gran medida al sabor de la miel mediante la interacción con los sabores de otros ingredientes. El ácido glucónico, por ejemplo, es un potenciador del sabor. Los ácidos aromáticos, tales como el ácido málico, provienen principalmente de las flores, y otorgan el aroma y el sabor de la miel (White 1980).

La miel puede contener hasta 18 aminoácidos. Sin embargo, el contenido de aminoácidos es casi despreciable en la miel, ya que representa sólo el 0,05-0,1% de la composición. El aminoácido principal es la prolina (White 1980).

Los ácidos orgánicos constituyen la mayor parte de los ácidos en la miel, que representan el 0,17-1,17% de la mezcla. El ácido glucónico está presente en mayor concentración y se forma por la acción de la enzima glucosa oxidasa. Otros ácidos orgánicos están presentes en menor proporción, tales como ácido fórmico, acético, butírico, cítrico, láctico, málico, piroglutámico, propiónico, valérico, palmítico, caprónico, y succínico, entre muchos otros, que finalmente no constituyen más del 0,5 % de la acidez (White 1980). Sin embargo, la diferencia en la composición de los ácidos determina fuertemente la clasificación de la miel por origen botánico y en cuando a sus propiedades nutracéuticas..

El nitrógeno total en la miel, procedente del material vegetal y de las propias abejas, es bajo y variable, presentando un valor medio de 0.04 % con valores extremos entre 0 y 0.13%; su distribución se encuentra en forma de aminoácidos libres: 100 mg/100g de extracto seco, de los cuales la prolina, constituye entre el 50 y 85% de la fracción de aminoácidos seguida por la lisina (White 1980). Las mieles genuinas según lo sugerido por el Codex Alimentarius Mundial deben contener un mínimo de 180 mg prolina/kg miel. Sin embargo, es necesario considerar que existen grandes variaciones según el tipo de miel (White 1980)

La acidez de la miel es uno de los factores que contribuye al flavor (sabor y aroma), así como a su estabilidad frente al ataque microbiológico. Además, la actividad antibacterial y antioxidante atribuida a este producto apícola es de vital importancia para establecer sus condiciones de conservación. Se asocia con el contenido de glucosa, pues al ser oxidada por la enzima D-glucosa-oxidasa se convierte en ácido glucónico y lactona (White 1980). A pesar de esto, en la miel sólo se realiza el análisis de acidez libre, la cual se encuentra reglamentada en 50 meq/kg como contenido máximo.

3.2 Propiedades Nutricionales

La miel es un alimento energético, la alta concentración de azúcares de fácil asimilación junto con los minerales y vitaminas que posee la convierten en alimento natural valioso. El valor energético de 100 gramos de miel es aproximadamente 320 Kcal (Fattori 2004). Su poder edulcorante es mayor que el de la sacarosa, por lo cual puede utilizarse en menor cantidad que el azúcar para lograr el mismo efecto (Fattori 2004).

La miel posee alta presión osmótica, lo cual es importante para el organismo porque aumenta la absorción de los azúcares. Puede ser una fuente de energía para atletas y personas sometidas a esfuerzos físicos (Fattori 2004).

Los azúcares complejos de la miel se absorben en el organismo por transporte activo, es decir, el mecanismo que le permite a las células transportar sustancias disueltas a través de su membrana desde regiones de menor concentración a otras de mayor concentración; dicho proceso requiere energía, puesto que el material debe moverse en contra del gradiente de concentración. Este hecho condiciona la velocidad de absorción, ya que depende de la disponibilidad de moléculas encargadas de llevar a cabo ese transporte. Como consecuencia, aquellos enfermos que sufren perturbaciones en el metabolismo de los glúcidos y que deben consumir una dieta baja en azúcares tendrán menor riesgo de un aumento brusco de glucosa en la sangre que con la sacarosa (Fattori 2004). Cuando se la combina con alimentos ricos en proteínas o en grasas ayuda a su digestión; también puede acelerar el metabolismo del alcohol; contribuye a la motilidad intestinal y a la absorción de calcio.

3.3 Propiedades Fisicoquímicas

El punto de fusión de la miel cristalizada es entre 40 y 50°C, dependiendo de su composición. Por debajo de esta temperatura, la miel puede encontrarse en un estado metaestable, lo que significa que no cristalizará sino hasta que se añade un cristal de siembra; más a menudo, se encuentra en un estado lábil, siendo una solución saturada con azúcares suficientes para cristalizar espontáneamente (White 1980).

La velocidad de cristalización se ve afectada por la relación de los principales azúcares, fructosa y glucosa, así como el contenido de dextrina. La temperatura también afecta la velocidad de cristalización, la cual es más rápida entre 13 y 17°C. Por debajo de 5°C, la miel no se cristaliza y, por tanto, la textura y sabor originales se pueden conservar por un tiempo largo (White 1980).

Normalmente, la miel se encuentra por debajo de su punto de fusión, y por ende es un líquido subenfriado. A temperaturas muy bajas, la miel no se congela, sino que su viscosidad se incrementa. La miel tiene una transición cristalina entre -42 y -51°C. Por debajo de esta temperatura, la miel entra en un estado vítreo y se convertirá en un sólido amorfo (Kántor et al. 1999).

La viscosidad de la miel se ve muy afectada por temperatura y el contenido de agua. Cuanto mayor sea la humedad, la miel fluirá más fácil. Por encima de su punto de fusión, sin embargo, el agua tiene poco efecto sobre la viscosidad. Aparte del contenido de agua, la composición de la miel también tiene poco efecto sobre la viscosidad. A 25°C, la miel que contiene 14% de humedad generalmente tendrá una viscosidad de alrededor de 400 poises, mientras que una miel que contiene 20% de humedad tendrá una viscosidad de alrededor de 20 poises (White 1980). El aumento de la viscosidad debido a la temperatura se produce lentamente, por ejemplo, una miel que contiene 16% de humedad, a 70°C tendrá una viscosidad de alrededor de 2 poises, mientras que a 30°C, la viscosidad será de alrededor de 70 poises. A medida que avanza de refrigeración, la miel se vuelve más viscosa a un ritmo cada vez más rápido, llegando a 600 poises a 14°C. Esto sucede debido a que su tensión superficial es baja.

La miel tiene una conductividad térmica muy baja, ya que la fusión de la miel cristalizada puede generar fácilmente su caramelización localizada si la fuente de calor está a alta temperatura, o si no se distribuye uniformemente (Bogdanov 2009).

En cuanto a su conductividad eléctrica, debido a la presencia de electrolitos, provenientes de los ácidos y minerales presentes, ésta puede variar, y se utiliza como parámetro de determinación de la calidad de la miel relacionada con su contenido de cenizas (White 1975).

El efecto de la luz sobre la miel es útil para determinar su tipo y su calidad, pues las variaciones en el contenido de agua alteran su índice de refracción, y su contenido de agua puede medirse fácilmente con un refractómetro. Típicamente, el índice de refracción de la miel estará en el intervalo de 1,504 a 13% de humedad, a 1,474 a 25%. La miel también tiene un efecto sobre la luz polarizada, en que va a rotar el plano de polarización. La fructosa dará una rotación negativa, mientras que la glucosa dará una positiva. La rotación en general se puede utilizar para medir la relación de estos azúcares en la mezcla.

La miel es de carácter higroscópico, por lo tanto, su almacenamiento tiene que ser en recipientes herméticos con el fin de evitar su dilución y fermentación debido al incremento de la humedad (Fattori 2004).

3.4 Características Microbiológicas

La miel posee una alta osmolaridad que está asociada con su funcionalidad y sus propiedades antibacteriales. Esta se relaciona con el nivel de peróxido de hidrógeno y componentes como lisozima, ácidos fenólicos y flavonoides (Fattori 2004) que contribuyen con la actividad antimicrobiana y antioxidante; dichas características permiten una fácil acción contra bacterias tales como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*.

La miel presenta un contenido de microorganismos que se considera bajo debido a la alta concentración de sólidos. La presencia de estos microorganismos puede deberse a la contaminación por las mismas abejas y al manejo en los métodos de extracción y almacenamiento de la miel. Por ende, esta flora microbiana puede clasificarse en microorganismos propios de la miel y secundarios ocasionales. Entre ellas, se encuentran bacterias del género *Bacillus* en estado esporulado y vegetativo, las cuales no generan efectos negativos sobre la miel, también se encuentran hongos y mohos probablemente debidos al aparato intestinal de las abejas y del ambiente, reconociéndose entre ellos géneros como *Aspergillus*, *Chaetomium*, *Penicillium*, *Peyronelia* y *Mucor*; adicionalmente puede haber contaminación por hongos del género *Acosphaera apis* (Orden *Acosphaerales*) y *Acosphaera major* (Fattori 2004).

En cuanto a las levaduras (introducidas por las abejas en la colmena, con el néctar, polen o mielato, o por las mismas abejas durante las operaciones de limpieza, al transportarlas sobre o dentro de su organismo) se encuentran de tipo osmófilo, perteneciente al género de *Saccharomyces*, entre las que se encuentra la *Saccharomyces bisporus* variedad *mellis*, y *Saccharomyces rouxii*, *Saccharomyces bailii* variedad *osmophilus*. Estas levaduras son un indicativo del manejo general del apiaro, por lo cual se ha establecido por parte de la MERCOSUR un límite máximo de 10^2 UFC/g para el conteo de hongos y levaduras (Fattori 2004). Estas levaduras, resultan un inconveniente con la maduración de la miel según Shimanuki y Knox, 1991, que han reportado además *Zygosacharomyces* y *Succhuromyces spp*, entre las levaduras dominantes, aunque también se reconocen géneros como *Nematospora*, *Schizosctcharomyces*, *Schwanniomyces*, *Torulu*, *Zygosacchuromyces* y *Rhotorula* (White 1975),(White 1980).

4. Mercado

De acuerdo con la información histórica consultada en Faostat, (FAO 2012) y haciendo el análisis en Microsoft Excel de los datos obtenidos, se encuentra lo siguiente:

En la Figura A-2 se presenta la producción de miel en toneladas; en esta se puede observar la evolución histórica desde el año 1961 hasta el año 2010, donde la producción se ha incrementado desde 600000 toneladas hasta 1500000 toneladas y que a partir de 2008 tiende a permanecer constante:

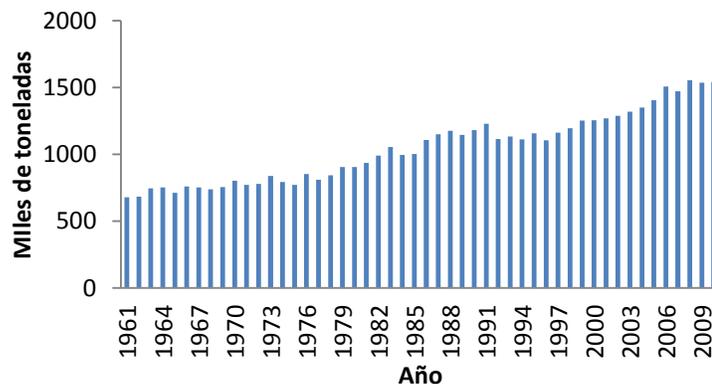


Figura A-2. Producción mundial de miel

La producción mundial de miel es llevada a cabo por 144 países; pero tiene como principal productor a la Unión Soviética, con un promedio histórico de 204200 toneladas, seguida por China con 171100 toneladas, Estados Unidos con 94300 toneladas y Ucrania con 62200

toneladas. México, la Federación Rusa, Argentina, India y Turquía con una producción entre 40000 y 50000 toneladas. Etiopía, Canadá y Alemania, con una producción entre 20000 y 30000 toneladas. El resto de países (132) participan con pequeñas cantidades, que unidas representan 415900 toneladas. En el caso de Colombia, se encuentra en el puesto 61 con una producción promedio de 1985 toneladas, que representa el 0.20% de la producción mundial. La distribución de la producción se presenta en la figura A-3:

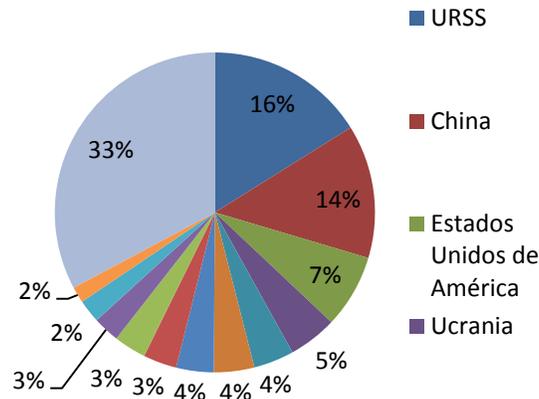


Figura A-3. Distribución porcentual de la producción mundial de miel

En cuanto a lo que sucede en Colombia, en la figura A-4 se presenta el comportamiento histórico para la producción de miel, donde se observa un crecimiento hasta el año 1983 y luego algunas variaciones de crecimiento y decrecimiento, siendo los valores actuales del orden de 1500 toneladas:

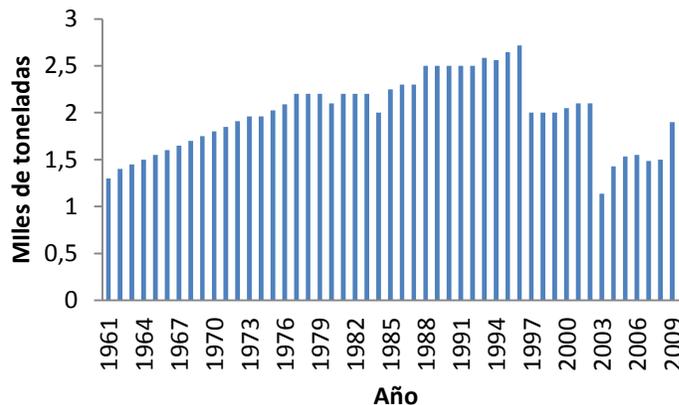


Figura A-4. Producción de miel en Colombia

En cuanto a la variación del precio internacional promedio de la miel en dólares por tonelada desde el año 1991 hasta el año 2009, se observa la figura A-5, en la que el precio inicial era

de 4000 dólares por tonelada, el cual se ha ido incrementando, hasta alcanzar un valor de 6000 dólares por tonelada. De acuerdo con lo reportado por (Laverde et al. 2010) y (Espinal et al. 2006), quienes reportan que el precio promedio histórico de Colombia por tonelada es de 15000 dólares:

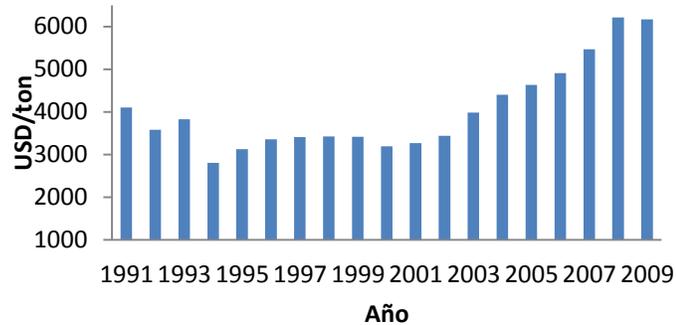


Figura A-5. Variación histórica del precio de la miel por tonelada

En cuanto a las importaciones y a las exportaciones de miel, los principales exportadores de miel son China, Argentina, México y Hungría. En cuanto a los países importadores, se encuentran Alemania, Estados Unidos, Japón, Reino Unido y Bélgica. Colombia se encuentra en el puesto 69 entre 162 países exportadores de miel, con un valor promedio anual de 111000 dólares de los 366 millones de dólares que representa el valor total promedio de las exportaciones mundiales. En el caso de los importadores de miel, Colombia se encuentra en el puesto 98 entre 196 países con un valor de 45000 dólares de los 374 millones de dólares que representan el valor total promedio de las importaciones mundiales, lo cual se muestra en las tablas A-4 y A-5:

Tabla A-4. Principales exportadores mundiales de miel

	País	Miles de toneladas	Millones de dólares
1	China	53.15	53.44
2	Argentina	42.805	49.40
3	México	32.695	30.70
4	Alemania	10.51	26.99
5	Hungría	11.24	18.52
69	Colombia	0.09	0.11

Tabla A-5. Principales importadores mundiales de miel

	País	Miles de toneladas	Millones de dólares
1	Alemania	72.15	87.56
2	Estados Unidos	44.10	58.42
3	Japón	28.99	31.92
4	Reino Unido	19.78	26.06
5	Bélgica	10.42	23.79
96	Colombia	0.02	0.05

Los precios de la miel a nivel internacional han variado a lo largo del tiempo, presentándose una estabilización alrededor de 6000 dólares por tonelada, y aunque Colombia no sea un país importador ni exportador, tiene oportunidades en el mejoramiento de su costo de producción, mejorando los procesos y diversificando en el uso de la miel producida.

4.2.2.6 Usos y Aplicaciones

Aunque un gran número de documentos y artículos se han publicado sobre el tema, la mayoría se han concentrado en el análisis bioquímico y los usos alimenticios y no alimenticios. Los estudios científicos y la tradición cultural de diferentes pueblos han llevado a la utilización de la miel con diferentes fines, según lo reportado en 1990, en el Journal of the Royal Society of Medicine (McInerney 1990).

La mayoría de las propiedades antibacterianas y antifúngicas de la miel han sido bien documentados (McInerney 1990), ya que la miel sin diluir inhibe el crecimiento de organismos tales como *Staphylococcus aureus*, enteropatógenos y *Candida albicans*. Se ha demostrado que la miel a una concentración de 40% es bactericida para diversas bacterias gram-negativas y gram-positivas, en particular de *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia coli*, enteropatógenos y el cólera. En concentraciones entre 30% y 50% se encontró que su efecto antibiótico era superior a antibióticos como cefaloridina, ampicilina, gentamicina,

nitrofurantoina, ácido nalidixico y cotrimoxazol por inhibir el crecimiento de los nueve tipos de organismos patógenos. El mecanismo del efecto antibacteriano de la miel sigue siendo una especulación, pero se ha explicado debido a la contracción de la pared celular bacteriana, debido al efecto osmótico, pH bajo, y la presencia de sustancias bactericidas (McInerney 1990).

También se ha probado la miel en el tratamiento de heridas quirúrgicas infectadas, quemaduras y en el manejo postoperatorio. Existen estudios en los que se ha demostrado que la aplicación directa de miel en las heridas puede evitar el injerto de piel, el desbridamiento quirúrgico e incluso la amputación (McInerney 1990).

El uso más común de la miel, reportado en 2004 es el de endulzante en lugar de la sacarosa tradicional (MAAREC 2004). La miel es utilizada como fuente de energía, pues sus azúcares simples son directamente absorbidos en la sangre a través de la digestión. Se puede utilizar la miel en mezclas para bebidas calientes y frías, así como en aderezos para ensaladas y vegetales, salsas para carnes y postres. Se recomienda su uso también para productos de panadería tales como panes, galletas, tortas y dulces, pues ayuda a la vida útil de estos productos. Además se puede usar como materia prima en la elaboración de hidromieles y bebidas destiladas de miel (MAAREC 2004).

Es bien conocido el uso de la miel en el campo cosmético, como reporta (Mia 2010), en el cuidado de la piel como humectante, desinfectante para la piel con acné y en el cuidado del pelo, para dar fortaleza.

En el campo médico, una revisión realizada en Manchester, (Bardy et al. 2008) menciona que normalmente en los estudios clínicos con miel, el tamaño de la muestra es pequeño, lo cual puede influir en la importancia de los hallazgos. Afirman que la calidad de los estudios relativos a la miel es generalmente pobre, pero que también existen algunas evidencias que apoyan la eficacia de la miel. La miel puede ser considerada como una opción de tratamiento o como complemento a la atención estándar. La mayoría de los estudios han puesto de manifiesto los resultados positivos y notables resultados en los que se ha utilizado miel (Bardy et al. 2008). Afirman que la miel promueve la curación más rápida, reduce la estancia hospitalaria, minimiza las cicatrices, elimina las infecciones, neutraliza el mal olor, alivia el dolor y es aceptada por los pacientes. Reportan también que se encontró particularmente eficaz en la curación de heridas y la reducción de las infecciones y la inflamación en pacientes con cáncer, así como se encontró que es útil en la reducción de la

gravedad y la duración de la mucositis inducida por radiación para pacientes con cáncer de cabeza y cuello (Bardy et al. 2008).

B. Anexo: Vigilancia tecnológica

La búsqueda de información a través de internet es hoy en día una de las principales herramientas para los investigadores con el fin de realizar vigilancia tecnológica.

Utilizando el buscador Google académico, se observa lo siguiente al utilizar diferentes palabras clave en inglés: por lengua electrónica, se encuentran 5280 referencias reportadas; a medida que la búsqueda se hace más específica, la cantidad de referencias reportadas disminuye, por ejemplo, en el caso de la búsqueda utilizando vino y lengua electrónica, se encuentran 1360 referencias; con los términos miel y lengua electrónica 269. Es importante destacar que buscando hidromiel y lengua electrónica, no se tiene ningún resultado.

Por otro lado, realizando búsquedas con las mismas palabras clave en las principales bases de datos, se encontró una tendencia similar a la observada en Google Académico, como se presenta en la Figura B-1:

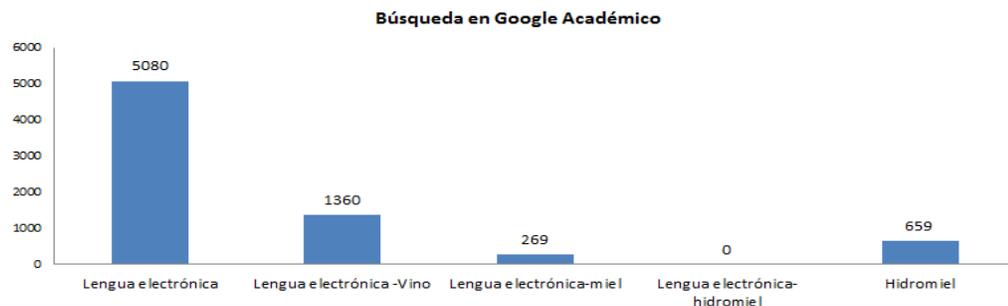


Figura B-1. Número de publicaciones encontradas utilizando Google Académico

In Figure B-2 se puede observar que en la base de datos Science Direct es donde se puede encontrar el mayor número de publicaciones, seguida por Proquest y Wiley Library. La

mayoría de información se encuentra utilizando lengua electrónica como palabra clave, lo cual corresponde a 1915 referencias; utilizando hidromiel como lengua electrónica se encuentran 256 referencias, y cuando se utiliza lengua electrónica y vino, se encuentran 598.

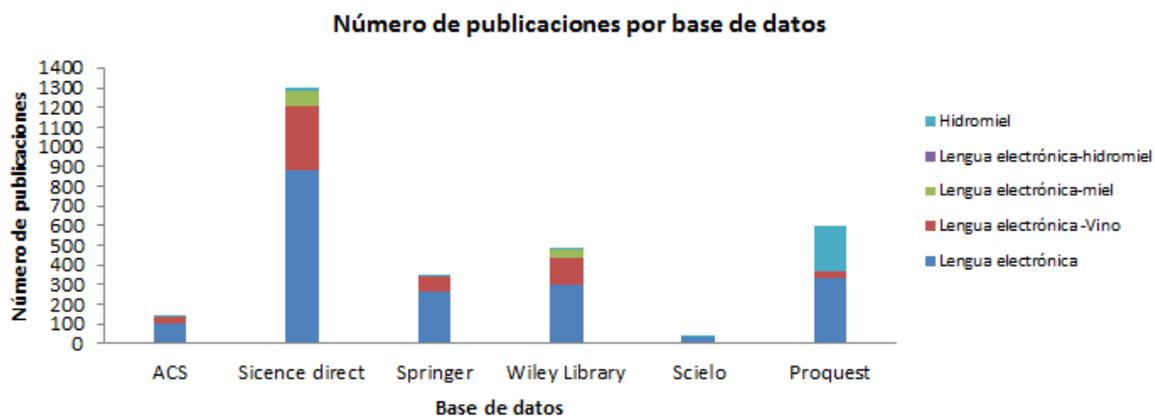


Figura B-2 Número de publicaciones en diferentes bases de datos

C. Anexo: Información sobre el hidromiel

1. Fermentación

En el proceso de fermentación se disocian las moléculas de glucosa mediante su fosforilación, sin variar el poder reductor neto de la célula, a través de lo cual se genera energía en un medio anaerobio y se sintetiza piruvato con el que la célula genera alcohol. De este modo, la fermentación complementa a la glicólisis por la oxidación de la coenzima nicotinamida adenina, producida en la glicólisis, regenerándola a su forma oxidada NAD⁺, la cual interviene nuevamente para producir más energía en forma de ATP.

Por lo cual, la energía química en la fermentación deriva de la oxidación de compuestos reducidos, donde la transferencia de electrones se produce hasta llegar a un aceptor final que es un compuesto orgánico oxidado; a diferencia de los procesos de oxidación comunes, donde el aceptor final de los electrones de la oxidación es el oxígeno, o cualquier compuesto inorgánico oxidado. Por consiguiente, en un proceso de fermentación tanto el donador de electrones como el aceptor, son compuestos de carácter orgánico, mientras que en un proceso de respiración el donador de los electrones es orgánico y el aceptor inorgánico.

La fermentación alcohólica, es un proceso anaeróbico realizado generalmente por levaduras y algunas bacterias. Estas transforman el azúcar en alcohol etílico y dióxido de carbono, principalmente, tras un proceso celular que comienza después de que la glucosa entra en la célula y es degradada a la forma de ácido pirúvico (Fattori 2004).

1.1 Fermentación etanólica

La fermentación alcohólica es un proceso biológico en ausencia oxígeno, originado por la actividad de algunos microorganismos que procesan los carbohidratos tales como glucosa, fructosa, sacarosa, etc., para obtener como productos, dióxido de carbono y unas moléculas

de ATP que consumen los propios microorganismos en su metabolismo celular energético anaeróbico. El etanol resultante se emplea en la elaboración de algunas bebidas alcohólicas, tales como el vino, la cerveza, entre otros.

La fermentación alcohólica tiene como finalidad biológica proporcionar energía anaeróbica a los microorganismos unicelulares (levaduras) en ausencia de oxígeno. Por ello, disocian moléculas de glucosa y obtienen energía necesaria para sobrevivir, produciendo el etanol y el dióxido de carbono como desechos. Las levaduras y bacterias causantes de este fenómeno son microorganismos muy habituales en las frutas y cereales, y contribuyen en gran medida al sabor de los productos fermentados,

Dichos microorganismos viven en ambientes carentes de oxígeno, por lo cual, la fermentación alcohólica es un proceso anaeróbico.

Los microorganismos más usados para la producción de etanol son las levaduras. La levadura de panadería y cervecería, *Saccharomyces cerevisiae*, posee ventajas sobre otras levaduras como la tolerancia a etanol, alta velocidad de conversión del sustrato y crecimiento a pH 4.0-5.0, estas condiciones implican un bajo riesgo de contaminación y sencillez de la operación en el fermentador.

Las levaduras convierten las hexosas, vía glicólisis, en piruvato y posteriormente decarboxilan piruvato a acetaldehído. Para mantener el balance rédox, el acetaldehído es reducido a etanol. Por esta vía se generan dos moles de ATP por mol de hexosa.

Las levaduras productoras de etanol consumen como sustrato algunos monosacáridos y disacáridos. Una desventaja de las levaduras durante la fermentación de etanol es mantener un balance delicado en el suministro de oxígeno, para mantener activa la mitocondria y el metabolismo de enzimas involucradas en la síntesis de ácidos grasos de membrana.

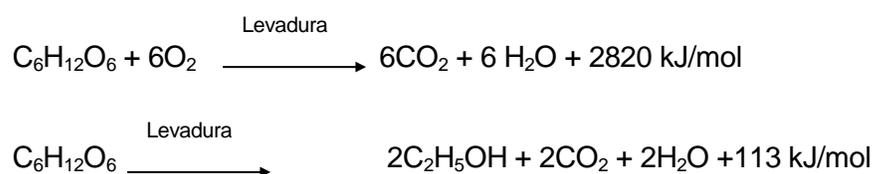
1.2 Microorganismos en la fermentación etanólica

Algunas especies de levaduras del género *Saccharomyces* son capaces de llevar a cabo el proceso de fermentación, propiedad que se ha explotado desde hace muchos años en la producción de pan y de bebidas alcohólicas. Dentro del género *Saccharomyces*, la especie *cerevisiae* constituye el microorganismo eucariote más estudiado

Desde finales del siglo XIX se reconocieron algunas de las ventajas que ofrece el uso de la levadura de pan, *Saccharomyces cerevisiae*, como modelo biológico en la investigación: por un lado, la facilidad con la que se obtienen grandes cantidades de este microorganismo; y por otro, el hecho de que *S. cerevisiae* posee un ciclo de vida que al incluir una fase sexual, permite abordar estudios con las herramientas que provee la genética formal. Otra característica de esta levadura es el tamaño de su genoma, que por ser pequeño facilitó su secuenciación (Cuenca & Díaz 2003)

Para su crecimiento requiere sales inorgánicas, oxígeno y azúcar y, un pH entre 4 y 6. Es un organismo mesófilo, ya que crece a temperaturas entre 25 y 40°C. Su temperatura óptima está entre 32 y 35 °C. Sus requerimientos nutricionales se basan en una relación aproximada C:N de 100:12, la cual debe ser suministrada por el medio. Resiste concentraciones de etanol hasta 12% (v/v). Su forma es redondeada y su tamaño varía entre 5 y 8 µm (Cuenca & Díaz 2003)

Por ser un organismo facultativo, puede llevar a cabo las reacciones de respiración y de producción de etanol, las cuales son exotérmicas (Cuenca & Díaz 2003)



Esta cepa es comúnmente empleada en la producción de vinos. Aunque es capaz de emplear un amplio rango de mono- di- y oligosacáridos; los cuales requieren en primer lugar una gluconeogénesis, donde se forman fosfatos a partir de hexosas y se emplea la glucosa6-fosfato para la producción de carbohidratos de almacenamiento y para el mantenimiento dentro de la vía metabólica de la hexosa monofosfato, en la cual, sintetiza la ribosa necesaria en nucleótidos (Cuenca & Díaz 2003)

2. Clasificación

Cada tipo de hidromiel es diferente, y cada sabor característico depende del tipo de miel empleado, específicamente de su origen botánico o geográfico, características que influyen

en sus diferencias organolépticas. El hidromiel puede tener gas o no, puede ser seco o dulce. Las variedades dulces a menudo se comparan con el vino Riesling (Berry 2009).

Dentro de las clases de hidromiel más reconocidas se encuentran las siguientes:

Tabla C-1. Clasificación de los hidromieles

Clase	Característica
Bracket o Braggot	Hecho con malta
Cyser	Producido con manzanas, sidra de manzana o jugo de manzana
Melomel	Hecho con fruta, a excepción de las manzanas o las uvas
Metheglin	Elaborado con hierbas o especias
Pyment	Elaborado con uvas, jugo de uva o mosto de uva concentrado
Tradicional	Producido a partir de más de un tipo de miel y sin frutas, hierbas o especias.

3. Mercado del Vino

Con el fin de establecer la importancia del desarrollo de bebidas tipo vino, es necesario tener en cuenta el comportamiento del mercado. Los datos reportados por Faostat (FAO 2012), permiten hacer un análisis de los datos históricos reportados, el cual revela el siguiente comportamiento de los resultados:

Las exportaciones mundiales, desde el año 1961 hasta el año 2009 han tenido una tendencia al incremento tanto en volumen como en valor en dólares, lo cual se ve reflejado en las figuras C-1 y C-2:

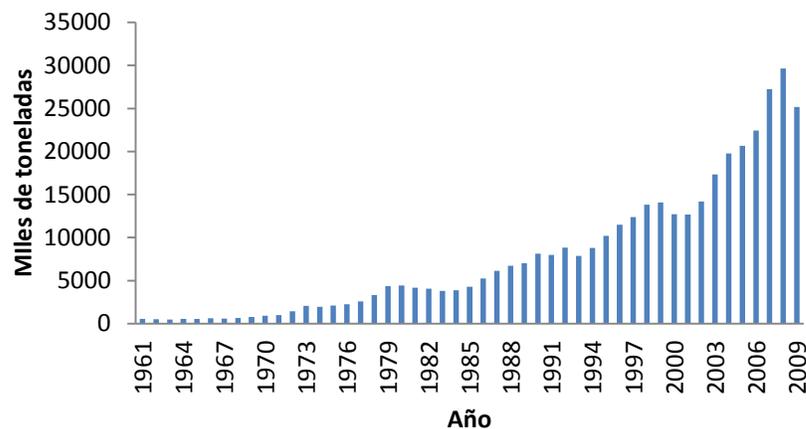
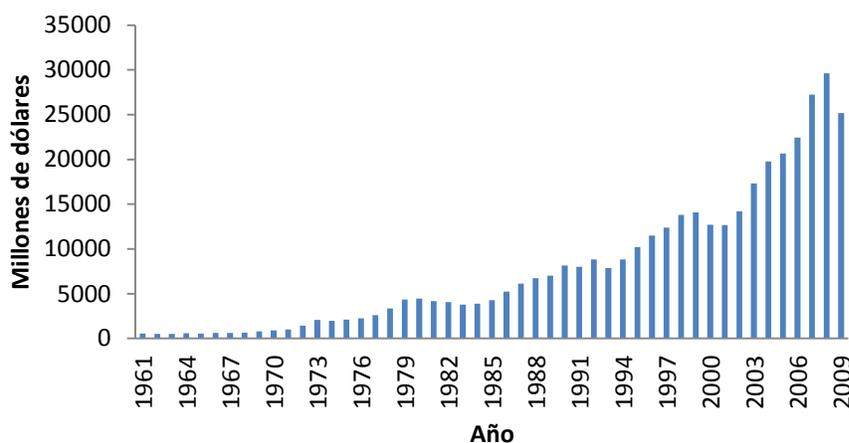


Figura C-1. Comportamiento de las exportaciones mundiales de vino en toneladas**Figura C-2. Comportamiento de las exportaciones mundiales de vino en millones de dólares**

En cuanto los países que principalmente exportan vino, se presentan a continuación con las exportaciones en toneladas y miles de dólares. Colombia ocupa el puesto 105 entre 166 países, como se presenta en la tabla C-2:

Tabla C-2. Principales países exportadores de vino

	País	Miles de toneladas	Millones de dólares
1	Italia	1173.38	1374.77
2	Francia	981.68	3050.66
3	España	643.11	693.27
4	Argelia	319.05	55.80
5	Portugal	200.99	310.96
105	Colombia	0.02	0.04

Un comportamiento similar al de las figuras C-1 y C-2 y puede observarse para las importaciones mundiales, que se presentan en las figuras C-3 y C-4:

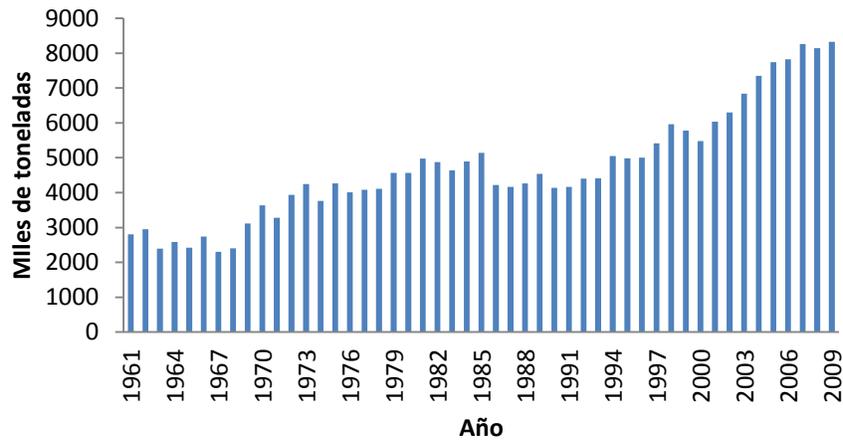


Figura C-3. Comportamiento de las importaciones mundiales de vino en toneladas

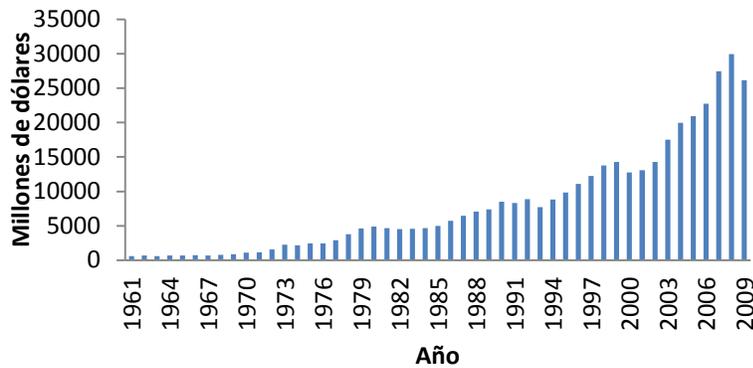


Figura C-4. Comportamiento de las importaciones mundiales de vino en millones de dólares

En la tabla C-3 se presentan los principales países importadores de vino de acuerdo con las toneladas importadas y el valor de las importaciones en millones de dólares Colombia, se encuentra en el puesto 64 entre 206 países.

Tabla C-3. Principales países importadores de vino

	País	Miles de toneladas	Millones de dólares
1	Alemania	954.35	1079.72
2	Francia	673.45	344.76
3	Reino Unido	560.17	1450.98
4	URSS	461.49	321.56
5	Federación de Rusia	339.92	363.45
64	Colombia	3.91	7.00

En las figuras C-5 y C-6 se presenta el comportamiento para las importaciones de vinos en Colombia. Es importante destacar el incremento importante en el volumen de estas importaciones y el valor que estas representan, ya que en el año 2009 correspondieron a 14 mil toneladas, que en dinero fueron 35 millones de dólares.

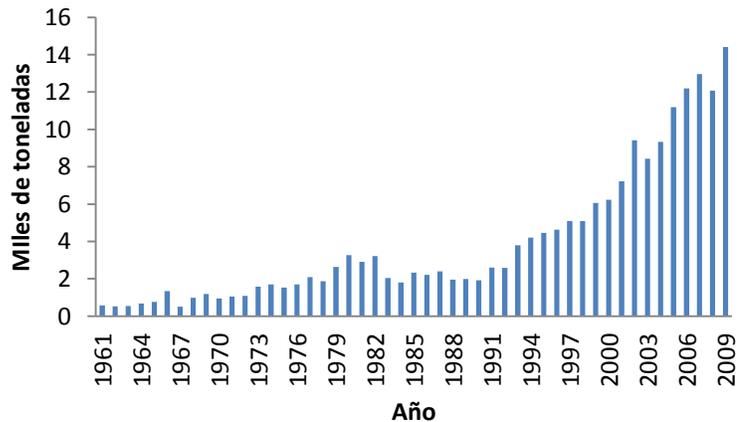
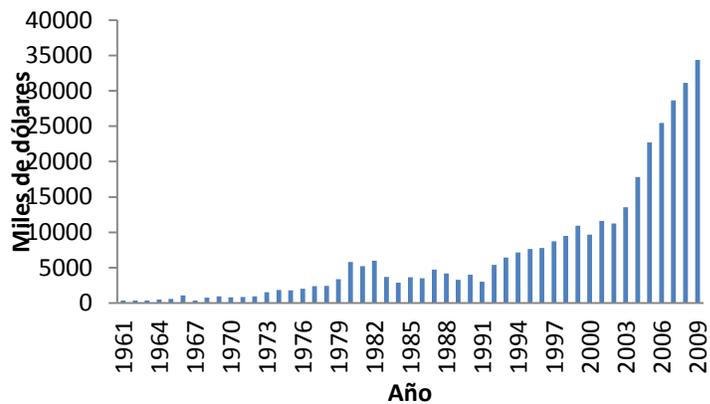


Figura C-5. Comportamiento de las importaciones de vino en Colombia en toneladas**Figura C-6. Comportamiento de las importaciones de vino en Colombia en miles de dólares**

Se debe tener en cuenta que para Colombia las exportaciones de vino no representan un papel importante.

4. Mercado del Hidromiel

De acuerdo con lo reportado por (Berry 2009), desde tiempos ancestrales hasta hoy en día, la producción de hidromiel existe alrededor de todo el mundo. Aunque hoy en día el número de mercados es menor, la hidromiel se puede encontrar en América del Norte (Canadá y los Estados Unidos), América del Sur (por ejemplo, Uruguay), Europa (por ejemplo, Italia, Irlanda, Polonia, Reino Unido), África (por ejemplo, Etiopía, Sudáfrica), y la región Asia-Pacífico (es decir, Australia y Nueva Zelanda). A pesar que el hidromiel sigue siendo un producto casero, existen consumidores en diferentes regiones el mundo que valoran este tipo de productos, pues generalmente tiene mejores características que otras bebidas alcohólicas comerciales, lo cual hace que este producto sea adecuado para pensar en su producción y exportación hacia algunos países.

Debido a que el vino de uva es líder al ser comparado con el hidromiel, es un reto grande la generación de valor con este producto y por ende las posibles ventas, pero es posible la apertura de nuevos mercados.

El hidromiel es generalmente vendido en licorerías, tiendas de vinos, en grandes mercados de hidromiel, como en Norte América y Europa, así como también en Australia y Nueva Zelanda.

Debido a que la demanda mundial de vinos se está incrementando, y a la preferencia por vinos de única y primera calidad, el hidromiel tiene un nicho importante al cual puede aspirar (Berry 2009). Según lo reportado por Euromonitor International, el incremento del valor en vino ha sido mayor al incremento de volumen de vino en todas las regiones del mundo; de 2002 a 2007, pues en volumen creció el 1%, mientras que el valor más del 7% (Berry 2009). También se espera que las ventas mundiales de vino en volumen crezcan aproximadamente un 10% entre 2005 y 2010, un aumento de alrededor de 28 billones de dólares. Se proyecta que los vinos que no son de uva se incrementen en volumen en 5% llegando a un volumen de ventas al año 2010 de \$ 21 mil millones para el año 2010. Se espera que disminuya la demanda de sake japonés y vino de arroz chino. Posiblemente los consumidores más jóvenes, y de clases alta y media de los mercados asiáticos, particularmente China, pueden actuar como motores importantes del crecimiento de la industria global del vino como el consumo de vinos (Berry 2009) que no sean de uva no tradicionales para ellos. En muchos mercados internacionales, el hidromiel sigue siendo parte de una industria artesanal o de productos caseros. Aunque el vino de uva todavía sigue siendo la variedad más popular de vino a nivel mundial, las preferencias y selecciones de vino son regionalmente diversas, pero genera la posibilidad e crear oportunidades para los productores de hidromiel en mercados internacionales.

4.1 Norteamérica

En Norteamérica, se pronostica un crecimiento continuo de la industria vinícola tanto en volumen como en ventas. Los consumidores de vino, hoy en día también tienen en cuenta los beneficios para la salud, demandan variedades de calidad superior, nuevos productos (por ejemplo, los vinos orgánicos y bajos en carbohidratos), embalajes dirigidos a las mujeres, entre otros. El incremento en los ingresos disponibles en las principales zonas urbanas de Norteamérica hace que probablemente se incremente un mercado de hidromiel, en particular en los Estados Unidos (Berry 2009). A pesar que el conocimiento generalizado del hidromiel es limitado, en Estados Unidos existen aproximadamente 60 fábricas productoras de hidromiel y 30 bodegas para su almacenamiento. El costo oscila entre 10,99

a 20 dólares por 750 ml, pero existen variedades de primera calidad se venden hasta en 70 dólares por 750 ml. En Estados Unidos se desarrolla un Festival internacional del hidromiel para productores de Estados Unidos, Canadá, Polonia, Dinamarca, Lituania y Sudáfrica, por lo cual, se convierte en uno de los mercados más atractivos para la venta de hidromiel (Berry 2009).

4.2 Asia Pacífico y Sudeste Asiático

En cuanto a las regiones de Asia Pacífico y Sudeste Asiático, los consumidores asiáticos quieren tener un estilo de vida más occidental, lo cual es impulsado por los medios de comunicación en Norteamérica. Allí, el consumo de vino de arroz y sake está disminuyendo, y se están importando vinos de uva, los cuales están incrementando su popularidad; este cambio de hábitos de consumo, también impulsado por viajes de negocios internacionales hace que los asiáticos estén llevando a sus casas "La cultura del vino para beber". Este consumo también se está incrementando por todas las actividades de mercado y festivales (Berry 2009). En China hay una tendencia marcada hacia el consumo de bebidas de alta calidad, por lo cual es un nicho importante para que el hidromiel pueda ubicarse. Para las mujeres asiáticas, el sake y el vino de arroz se consideran opciones muy masculinas, por lo cual la producción de hidromieles especiados y frutales puede llegar a ser un importante nicho de mercado en Asia. En Indonesia, el consumo de vino de frutas y hierbas es el más popular, por lo cual la producción del hidromiel con hierbas y especias puede generar una alternativa adicional para este mercado potencial (Berry 2009).

4.3 Europa Occidental

En Europa, varios países son culturalmente e históricamente tradicionales en la producción de hidromiel, y todavía existen consumidores y mercado para este tipo de productos. Sin embargo, las diferencias en las oportunidades de mercado no existen entre las regiones de Europa oriental y occidental. Los consumidores europeos del Este, por ejemplo, al igual que sus homólogos asiáticos, están avanzando gradualmente hacia el consumo de vinos más "sofisticados" de uva en lugar de "anticuado" vinos de frutas, como los ingresos disponibles y estilos de vida occidentales siguen aumentando. En Alemania, el vino de frutas más popular (75% de las ventas) es el vino de manzana, seguido por cerezas y ciruelas. Por ello, un hidromiel que incluya una infusión de frutas, hierbas o especias puede tener una oportunidad de mercado importante allí. Alemania sigue siendo el mayor consumidor de vinos que no sean de uva en Europa occidental, pues representa el 84% del consumo en

volumen y el 69% del total de ventas regionales (Berry 2009). En 2005 el volumen de vino ascendió a 98500 m³ (1,2 per cápita), y por un valor de \$ 428,9 millones de dólares. Italia es el segundo país consumidor de vinos que no son de uva, lo cual representa el 8% del consumo de volumen total y el 9% de las ventas en dólares para la región. Dentro de las variedades más populares están los vinos de melocotón y albaricoque, así como el hidromiel, que generalmente se disfrutan como aperitivos y vinos de postre por consumidores de mediana edad y mayores. Los niveles de consumo en 2015 fueron de 9400 m³ (0,2 per cápita), por un valor de 55,3 millones de dólares (Berry 2009).

4.4 Europa Oriental

En Europa oriental, Polonia es el segundo mayor mercado para vinos que no son de uva. En 2005 el valor en ventas del consumo regional de este tipo de vinos fue 51,5 millones de dólares y el consumo de 138600 m³ (3,6 L per cápita). Los vinos de manzana, grosella y ciruela son muy populares en Polonia, por lo cual la comercialización de hidromieles con infusiones de frutas puede ser exitosa en este mercado. Sin embargo, los vinos de fruta se consideran como las bebidas de los segmentos de consumidores con menor poder adquisitivo, ya que sus precios son bajos. El incremento de la clase media en Polonia y el aumento de ingresos de los consumidores puede reforzar aún más esta percepción. Bielorrusia es el país que tradicionalmente ha consumido vinos de frutas, ya que no se cultiva uva. Su consumo anual es de 261 m³ de vinos de frutas, lo cual representa el 57% del total del consumo de esta región. Se espera que la demanda de este tipo de vinos se incremente, ya que el gobierno allí tiene previsto promocionar y desarrollar la industria de vinos de uva y otras frutas, por lo cual el hidromiel puede tener un nicho de mercado adecuado en esta región.

Otros mercados como Rusia, Ucrania y República Checa tienen bajos consumos de vino de frutas, (27,9, 19,6 y 5,6 m³ respectivamente). En estos países los vinos dulces de frutas y los vinos de grosellas son muy populares. En República Checa el consumo de hidromiel es tradicional, por lo cual cuenta con muchas empresas grandes de hidromiel, así como también con empresas familiares (Berry 2009).

4.5 Lationamérica

En cuanto a Latinoamérica, Colombia, el mayor mercado de vino de manzana, lo cual representa el 49% del consumo en volumen y 24% en valor en dólares en el año 2005, es

decir, 11,7 m³ y 15,9 millones de dólares. Estos valores se deben a que en Colombia existe la producción a bajo costo de este tipo de vino, el cual es consumido generalmente por consumidores de clase media y baja para ocasiones especiales (Berry 2009). Si se desarrolla un hidromiel con precios competitivos con los vinos locales de manzana, puede resultar exitosa la producción y venta de hidromiel en Colombia.

Brasil experimentó el mayor crecimiento de volumen a nivel mundial de vinos de frutas desde 2002 hasta 2007 (30% de incremento), lo cual es significativamente más que la tasa anual global de 1% (Berry 2009). Probablemente este incremento se debe al interés en la cocina japonesa y la proliferación de restaurantes japoneses en el país. Se prevé que en este país los vinos de frutas pueden ser una alternativa no sólo para su consumo sino también para su producción local.

En Uruguay existe la producción artesanal y a pequeña escala de hidromiel. Normalmente se vende a 3.60 dólares por 750 ml, pero principalmente en botellas de un litro de 4,80 dólares (Berry 2009)

4.6 Medio Oriente y África

En el Medio oriente y África, importan algunos vinos, pero su industria de vinos es pequeña. Sin embargo, los Emiratos Árabes Unidos importan anualmente una considerable cantidad de vino de hielo canadiense (30000 dólares en 2008), sobre todo en Dubái, y se ubica 17 entre los mercados de exportación de vino de hielo de Canadá. Egipto, el puesto 21 de los destinos del vino de hielo canadiense, con exportaciones en 2005, por un valor de 7.541 dólares de las importaciones.

Se cree que el origen del hidromiel fue en África hace más de 20000 años, y sigue siendo parte importante de la cultura y tradición en países africanos. En Etiopía el vino de miel es llamado T'ej y sigue siendo la bebida nacional del país, pues es preferida por encima de los vinos de uva. Sin embargo, el T'ej es hecho en casa y no se vende comercialmente, pues cada familia tiene su receta propia, lo cual posiblemente puede limitar el mercado del hidromiel. Grahamstown, en Sudáfrica es sede de una planta productora de hidromieles que participa regularmente en el Festival Internacional de Hidromiel. Se prevé que el consumo de vino se incrementará en Suráfrica, Marruecos, Egipto e Israel, lo cual popularizará la cultura del vino y probablemente aumente la demanda del consumidor por productos de alta calidad de vinos internacionales, tales como el hidromiel.

4.7 Publicaciones acerca hidromiel

Tabla C-4. Publicaciones sobre hidromiel

Autores	Reporte
(Vidrih & Hribar 2007)	En este trabajo evaluaron tres tipos de hidromiel diferentes preparadas con mieles de castañas, limón y melón. Los tres tipos de hidromiel se prepararon inicialmente con 25°Brix, se llevó a cabo la fermentación a 15°C hasta que alcanzaron 14.2% de etanol (v/v). Se evaluó el perfil de alcoholes obtenido a lo largo de la fermentación, así como acetato de etilo. Se encontró que los panelistas prefirieron el hidromiel que tenía mayor cantidad de azúcares reductores que la que tenía menos azúcares.
(Sroka & Tuszyński 2007b)	En este reporte se evaluó el contenido de ácidos orgánicos del hidromiel a lo largo de la fermentación, utilizando el mismo tipo de levadura, para vino (Riesling), con relaciones miel:agua 1:3 y 1:2. Se utilizó como fuente de nitrógeno fosfato de amonio hidrogenado (0.4 g/l) y se adicionó ácido cítrico (0.25 g/l). A lo largo de la fermentación se evaluó el contenido de ácidos grasos utilizando cromatografía de gases, así como de ácido acético y succínico. Los mostos contenían ácidos grasos que se cree que pueden inhibir la fermentación, encontrándose como dominantes los ácidos decanóico, dodecanóico y octanóico. Se demostró que al inicio de la fermentación los ácidos predominantes fueron el acético y succínico, los cuales reducen el pH del mosto, mientras que el contenido de ácidos grasos cae entre un 70 y 80%; también disminuyen los ácidos fórmico, hexadecanoico y octadecanoico.
(M. Navrátil et al. 2001)	Este trabajo presenta la evaluación de la producción de hidromiel utilizando levaduras resistentes al etanol (de destilería) inmovilizadas en pectato de calcio, que tiene mayor resistencia mecánica que el alginato de calcio en un reactor continuo. Se encontró que este soporte puede ser más estable, y se logran tener menores tiempos de producción de hidromiel que al utilizar alginato de calcio como soporte. Este estudio permite establecer un avance en la forma de producción de hidromiel, incrementando la productividad de etanol y por ende, el tiempo de producción, haciendo que los costos disminuyan.

Autores	Reporte
(Kahoun, Rezková, et al. 2008)	<p>En este estudio se llevó a cabo la determinación de 25 compuestos fenólicos de diferentes muestras de hidromieles utilizando cromatografía líquida con un arreglo colorimétrico, y en el caso de hidroximetilfurfural, con detector UV. Se desarrolló un método el cual se optimizó en cuanto a la separación selectiva de cada uno de los compuestos fenólicos y la sensibilidad máxima en la detección electroquímica. Las muestras de hidromiel se diluyeron en la fase móvil 1:1 y 1:50 dependiendo de la concentración y filtradas. Se determinaron las concentraciones de estos compuestos en 50 muestras de hidromiel y se correlacionó con la concentración de hidroximetilfurfural. Se encontró ácido protocatéquico y ácido vanílico en el 98% de las muestras, y los compuestos presentes en el 10% de las muestras fueron catequina y ácido sinápico. Se encontraron agentes artificiales para mejorar el sabor, tales como vainiliina y etilvainillina, y el hidroximetilfurfural varió en concentraciones entre 2.47 y 158 mg/l. Se concluye que este método es aplicable para hidromiel, miel y otras muestras similares.</p>
(Mendes-Ferreira et al. 2010)	<p>La producción de hidromiel es un proceso que puede durar desde días hasta meses para finalizar. El proceso generalmente no es estandarizado, por lo cual los productos finales pueden tener diferentes características. En este trabajo se evaluó la producción de hidromiel utilizando una formulación de mosto que provea a la levadura para realizar una fermentación adecuada y al final, tener un producto de alta calidad. Primero, se centrifugó el mosto para reducir los sólidos insolubles, se pasteurizó a 65°C por 10 minutos y posteriormente se adicionó fuentes de nitrógeno y ácidos orgánicos. Se determinó que el perfil e intensidad de los aromas es mayor en los mostos a los que se le adicionó fosfato de diamonio, encontrándose una correlación entre la presencia de ésteres tipo acetato y etanoato, los cuales dan una sensación de mayor frutalidad en las bebidas fermentadas. Por otro lado, la adición de ácidos no tiene ningún efecto en la generación de etanol ni en la producción de diferentes compuestos aromáticos.</p>
(Main 2012); (The New York Times 2012);	<p>Se habla acerca de la historia del hidromiel, el cual nace en Grecia y se extiende por Europa oriental, teniendo nombres diferentes en cada una de las regiones donde es producido. En el New York Times se resaltan los eventos más importantes a nivel mundial en el caso de los hidromieles y su evaluación</p>

	sensorial, haciendo una reseña sobre la importancia, su sabor, origen y las diferentes oportunidades de desarrollo que hay en este momento para este tipo de bebidas.
Autores	Reporte
(Pereira et al. 2009)	Se reporta que el hidromiel es una bebida generalmente producida de manera casera, lo cual hace que los productores tengan muchos problemas con la uniformidad del producto y la generación de aromas no deseables debido a las levaduras que se utilizan, lo cual se debe posiblemente a la inhabilidad de la levadura a adaptarse al mosto y el estrés que pueden sufrir dependiendo de las características del mismo. Se trabajó con cinco tipos de levaduras aisladas de mieles y dos levaduras comerciales. Dichas levaduras se sometieron a estrés de presión osmótica, dióxido de azufre y alto contenido de etanol. Todas las levaduras presentaron el mismo comportamiento bajo estos estreses. Luego se tomaron dos levaduras aisladas y una comercial para evaluar el proceso de producción del hidromiel usando miel oscura y clara a las cuales se les adicionó dos suplementos, uno comercial y otro desarrollado en el laboratorio. Se encontró que una de las levaduras aislada de la miel presentó una fermentación adecuada, lo cual hace que tanto la composición de la miel como el tipo de microorganismo puede generar hidromieles de características adecuadas en un tiempo adecuado.
(Daniel & Schramm 1995); (McConnell & Schramm 2012)	Se da información tecnológica para la elaboración de hidromieles de diferentes tipos, así como consejos prácticos para el logro de un producto sensorialmente adecuado, teniendo en cuenta el tipo de miel, la temperatura de fermentación, el hidromiel deseado, entre otra información. Se presentan condiciones generales, la importancia de la miel, las condiciones de fermentación, adición de sustitutos.
(Wintersteen et al., 2005)	En este estudio evaluaron los efectos del tratamiento térmico en la capacidad antioxidante de hidromieles provenientes de dos tipos de mieles. Para ello utilizaron técnicas de cromatografía líquido para cuantificar los compuestos fenólicos, y se evaluó la capacidad antioxidante utilizando el método ORAC (oxygen radical absorbance capacity). Se evaluó la variabilidad de los componentes volátiles por cromatografía de gases. Se encontró que no hay influencia del tratamiento térmico en la capacidad antioxidante de los hidromieles evaluados y se encontró una relación fuerte entre la concentración total de los compuestos fenólicos con la capacidad antioxidante. Si se encontraron diferencias en el perfil aromático debido a los tratamientos térmicos realizados, por lo cual deben evitarse para perderlos en dicho tratamiento

	térmico.
(Qureshi & Tamhane, 1987; Qureshi, N, 1986)	Se evaluó la producción de hidromiel utilizando células inmovilizadas en alginato de calcio de Hansenula anómala y Saccharomyces cerevisae, las cuales se empacaron en reactores para llevar a cabo la producción continua de hidromiel, el cual se operó por 110 días, obteniéndose una hidromiel adecuada en un tiempo corto, y con características deseables.
Autores	Reporte
(Roldán et al., 2011)	Evaluaron la producción de hidromiel adicionando polen como fuente de nitrógeno y otros micronutrientes, en concentraciones entre 10 y 50 g/l. Se encontró que la adición de polen mejoró las características sensoriales del hidromiel, así como la velocidad de fermentación. Adicionalmente, se encontró que un hidromiel adecuado debe tener características preferidas por el consumidor que la beberá.
(Barrios & Principal 2010)	En este trabajo se caracterizó un hidromiel artesanal mediante un análisis físicoquímico y sensorial, el cual fue elaborado con mieles provenientes de Peña, estado Yaracuy, Venezuela con el fin de garantizar la calidad organoléptica y grado de aceptación de este producto. Se realizó análisis sensorial con 32 panelistas no entrenados, quienes evaluaron el hidromiel artesanal y el no comercial y no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los dos productos.
(Chen et al. 2013)	Este es un artículo en el que se llevó a cabo un experimento preliminar dirigido a los apicultores locales. Tomaron miel diluida y añadieron diferentes tipos de levaduras a una necesidad hecha de una miel de la región de Taiwán. Describieron las diferentes metodologías aplicadas a saber cómo el avance de la fermentación se iba, como HPLC, cromatografía de gases, entre otros.
(Gomes et al. 2013)	En este artículo se estudia la variación de los diferentes parámetros de la fermentación de hidromiel mediante el uso de la metodología de superficie de respuesta. Ellos hicieron diferentes experimentos y finalmente encontraron las condiciones óptimas sobre la base de todas las respuestas eran una temperatura de 24 ° C y una concentración de nutrientes de 0,88 g / L. Sus resultados mostraron que los valores experimentales y los predichos fueron bastante similares. Por lo tanto, sus modelos obtenidos pueden ser utilizados para optimizar la producción de hidromiel.
	En este artículo se muestra una alternativa de inmovilización de superficie para la producción de diferentes tipos de hidromiel. Utilizaron cáscara de uva liofilizada como un soporte para las levaduras. Se dieron cuenta de la adición de las cáscaras causa diferentes efectos positivos, especialmente aumentando

	la concentración final de etanol, y se encontró que los efectos debidos difusión de transferencia de masa no son importantes cuando las células se encuentran en una superficie.
Autores	Reporte
(Menezes et al. 2013)	Este capítulo de libro está relacionado con el uso de la miel de abejas sin aguijón para preparar hidromiel. Se explica de una manera general el proceso de producción de hidromiel usando este tipo de miel, teniendo en cuenta la pasteurización como una operación importante a 65°C durante 5 minutos antes de comenzar la fermentación y después de terminar. Se recomiendan el uso de bentonita para aclarar la bebida al final de la fermentación.
(Pereira et al. 2014)	En este artículo se muestra una comparación entre las tres formas de la fermentación: mediante el uso de células libres, células inmovilizadas en alginato de calcio y células inmovilizadas mediante el uso de alginato de calcio y el quitosano. Se encontraron diferencias significativas especialmente en compuestos aromáticos generados durante la fermentación, pero no se encontraron diferencias en el tiempo, pH, acidez, porcentaje de etanol, etc. Recomendaron decidir la forma de fermentación relacionada con resultados sensoriales que los consumidores podrían evaluar diferentes prados.

C. Anexo: Información sobre el hidromiel

1. Fermentación

En el proceso de fermentación se disocian las moléculas de glucosa mediante su fosforilación, sin variar el poder reductor neto de la célula, a través de lo cual se genera energía en un medio anaerobio y se sintetiza piruvato con el que la célula genera alcohol. De este modo, la fermentación complementa a la glicólisis por la oxidación de la coenzima nicotinamida adenina, producida en la glicólisis, regenerándola a su forma oxidada NAD⁺, la cual interviene nuevamente para producir más energía en forma de ATP.

Por lo cual, la energía química en la fermentación deriva de la oxidación de compuestos reducidos, donde la transferencia de electrones se produce hasta llegar a un aceptor final que es un compuesto orgánico oxidado; a diferencia de los procesos de oxidación comunes, donde el aceptor final de los electrones de la oxidación es el oxígeno, o cualquier compuesto inorgánico oxidado. Por consiguiente, en un proceso de fermentación tanto el donador de electrones como el aceptor, son compuestos de carácter orgánico, mientras que en un proceso de respiración el donador de los electrones es orgánico y el aceptor inorgánico.

La fermentación alcohólica, es un proceso anaeróbico realizado generalmente por levaduras y algunas bacterias. Estas transforman el azúcar en alcohol etílico y dióxido de carbono, principalmente, tras un proceso celular que comienza después de que la glucosa entra en la célula y es degradada a la forma de ácido pirúvico (Fattori 2004).

1.1 Fermentación etanólica

La fermentación alcohólica es un proceso biológico en ausencia oxígeno, originado por la actividad de algunos microorganismos que procesan los carbohidratos tales como glucosa, fructosa, sacarosa, etc., para obtener como productos, dióxido de carbono y unas moléculas

de ATP que consumen los propios microorganismos en su metabolismo celular energético anaeróbico. El etanol resultante se emplea en la elaboración de algunas bebidas alcohólicas, tales como el vino, la cerveza, entre otros.

La fermentación alcohólica tiene como finalidad biológica proporcionar energía anaeróbica a los microorganismos unicelulares (levaduras) en ausencia de oxígeno. Por ello, disocian moléculas de glucosa y obtienen energía necesaria para sobrevivir, produciendo el etanol y el dióxido de carbono como desechos. Las levaduras y bacterias causantes de este fenómeno son microorganismos muy habituales en las frutas y cereales, y contribuyen en gran medida al sabor de los productos fermentados,

Dichos microorganismos viven en ambientes carentes de oxígeno, por lo cual, la fermentación alcohólica es un proceso anaeróbico.

Los microorganismos más usados para la producción de etanol son las levaduras. La levadura de panadería y cervecera, *Saccharomyces cerevisiae*, posee ventajas sobre otras levaduras como la tolerancia a etanol, alta velocidad de conversión del sustrato y crecimiento a pH 4.0-5.0, estas condiciones implican un bajo riesgo de contaminación y sencillez de la operación en el fermentador.

Las levaduras convierten las hexosas, vía glicólisis, en piruvato y posteriormente decarboxilan piruvato a acetaldehído. Para mantener el balance rédox, el acetaldehído es reducido a etanol. Por esta vía se generan dos moles de ATP por mol de hexosa.

Las levaduras productoras de etanol consumen como sustrato algunos monosacáridos y disacáridos. Una desventaja de las levaduras durante la fermentación de etanol es mantener un balance delicado en el suministro de oxígeno, para mantener activa la mitocondria y el metabolismo de enzimas involucradas en la síntesis de ácidos grasos de membrana.

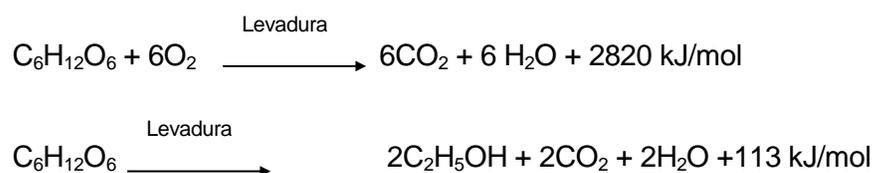
1.2 Microorganismos en la fermentación etanólica

Algunas especies de levaduras del género *Saccharomyces* son capaces de llevar a cabo el proceso de fermentación, propiedad que se ha explotado desde hace muchos años en la producción de pan y de bebidas alcohólicas. Dentro del género *Saccharomyces*, la especie *cerevisiae* constituye el microorganismo eucariote más estudiado

Desde finales del siglo XIX se reconocieron algunas de las ventajas que ofrece el uso de la levadura de pan, *Saccharomyces cerevisiae*, como modelo biológico en la investigación: por un lado, la facilidad con la que se obtienen grandes cantidades de este microorganismo; y por otro, el hecho de que *S. cerevisiae* posee un ciclo de vida que al incluir una fase sexual, permite abordar estudios con las herramientas que provee la genética formal. Otra característica de esta levadura es el tamaño de su genoma, que por ser pequeño facilitó su secuenciación (Cuenca & Díaz 2003)

Para su crecimiento requiere sales inorgánicas, oxígeno y azúcar y, un pH entre 4 y 6. Es un organismo mesófilo, ya que crece a temperaturas entre 25 y 40°C. Su temperatura óptima está entre 32 y 35 °C. Sus requerimientos nutricionales se basan en una relación aproximada C:N de 100:12, la cual debe ser suministrada por el medio. Resiste concentraciones de etanol hasta 12% (v/v). Su forma es redondeada y su tamaño varía entre 5 y 8 µm (Cuenca & Díaz 2003)

Por ser un organismo facultativo, puede llevar a cabo las reacciones de respiración y de producción de etanol, las cuales son exotérmicas (Cuenca & Díaz 2003)



Esta cepa es comúnmente empleada en la producción de vinos. Aunque es capaz de emplear un amplio rango de mono- di- y oligosacáridos; los cuales requieren en primer lugar una gluconeogénesis, donde se forman fosfatos a partir de hexosas y se emplea la glucosa6-fosfato para la producción de carbohidratos de almacenamiento y para el mantenimiento dentro de la vía metabólica de la hexosa monofosfato, en la cual, sintetiza la ribosa necesaria en nucleótidos (Cuenca & Díaz 2003)

2. Clasificación

Cada tipo de hidromiel es diferente, y cada sabor característico depende del tipo de miel empleado, específicamente de su origen botánico o geográfico, características que influyen en sus diferencias organolépticas. El hidromiel puede tener gas o no, puede ser seco o dulce. Las variedades dulces a menudo se comparan con el vino Riesling (Berry 2009).

Dentro de las clases de hidromiel más reconocidas se encuentran las siguientes:

Tabla C-1. Clasificación de los hidromieles

Clase	Característica
Bracket o Braggot	Hecho con malta
Cyser	Producido con manzanas, sidra de manzana o jugo de manzana
Melomel	Hecho con fruta, a excepción de las manzanas o las uvas
Metheglin	Elaborado con hierbas o especias
Pyment	Elaborado con uvas, jugo de uva o mosto de uva concentrado
Tradicional	Producido a partir de más de un tipo de miel y sin frutas, hierbas o especias.

3. Mercado del Vino

Con el fin de establecer la importancia del desarrollo de bebidas tipo vino, es necesario tener en cuenta el comportamiento del mercado. Los datos reportados por Faostat (FAO 2012), permiten hacer un análisis de los datos históricos reportados, el cual revela el siguiente comportamiento de los resultados:

Las exportaciones mundiales, desde el año 1961 hasta el año 2009 han tenido una tendencia al incremento tanto en volumen como en valor en dólares, lo cual se ve reflejado en las figuras C-1 y C-2:

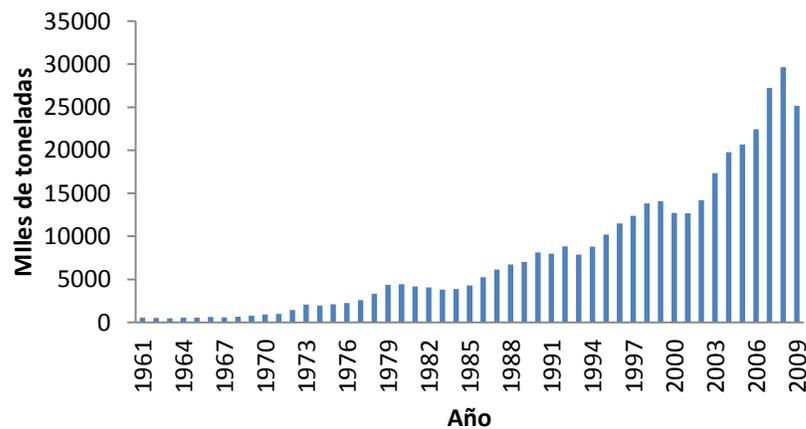


Figura C-1. Comportamiento de las exportaciones mundiales de vino en toneladas

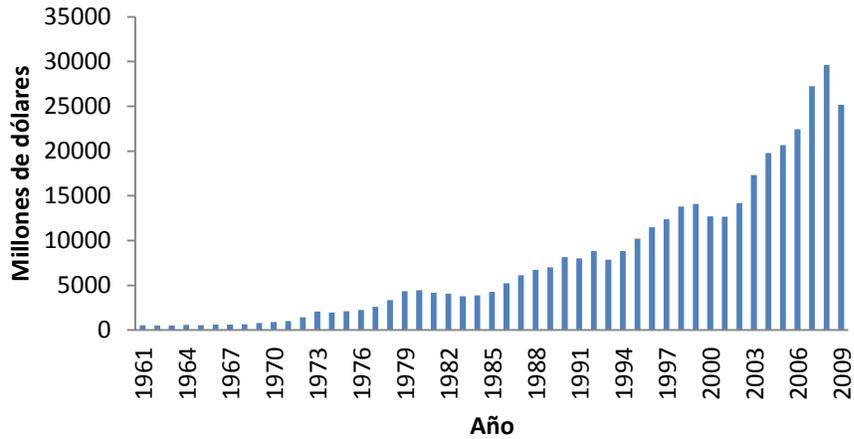


Figura C-2. Comportamiento de las exportaciones mundiales de vino en millones de dólares

En cuanto los países que principalmente exportan vino, se presentan a continuación con las exportaciones en toneladas y miles de dólares. Colombia ocupa el puesto 105 entre 166 países, como se presenta en la tabla C-2:

Tabla C-2. Principales países exportadores de vino

	País	Miles de toneladas	Millones de dólares
1	Italia	1173.38	1374.77
2	Francia	981.68	3050.66
3	España	643.11	693.27
4	Argelia	319.05	55.80
5	Portugal	200.99	310.96
105	Colombia	0.02	0.04

Un comportamiento similar al de las figuras C-1 y C-2 y puede observarse para las importaciones mundiales, que se presentan en las figuras C-3 y C-4:

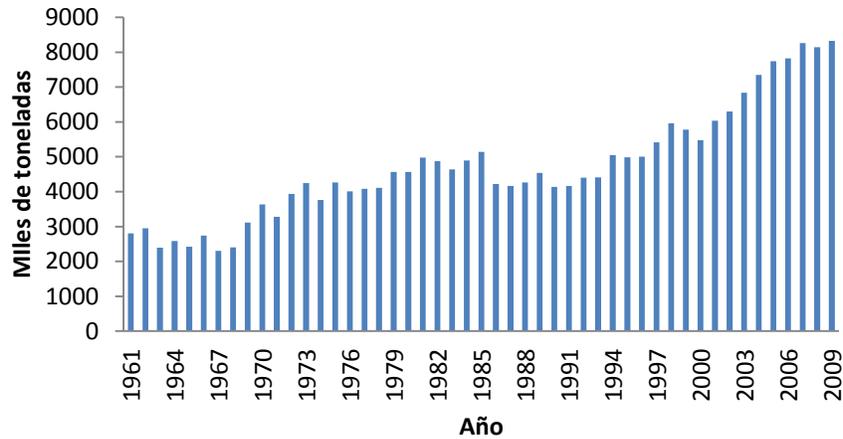


Figura C-3. Comportamiento de las importaciones mundiales de vino en toneladas

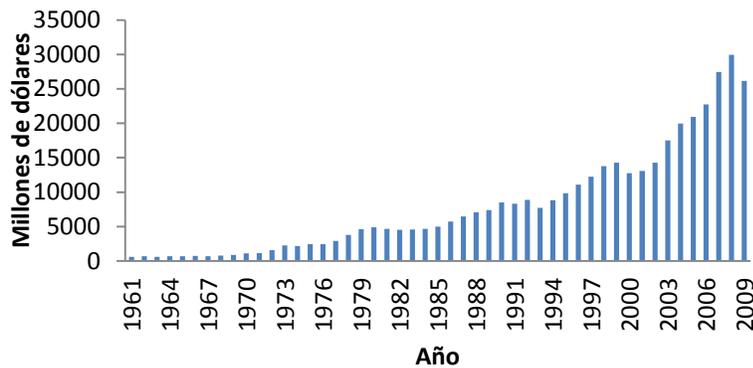


Figura C-4. Comportamiento de las importaciones mundiales de vino en millones de dólares

En la tabla C-3 se presentan los principales países importadores de vino de acuerdo con las toneladas importadas y el valor de las importaciones en millones de dólares Colombia, se encuentra en el puesto 64 entre 206 países.

Tabla C-3. Principales países importadores de vino

	País	Miles de toneladas	Millones de dólares
1	Alemania	954.35	1079.72
2	Francia	673.45	344.76
3	Reino Unido	560.17	1450.98
4	URSS	461.49	321.56
5	Federación de Rusia	339.92	363.45
64	Colombia	3.91	7.00

En las figuras C-5 y C-6 se presenta el comportamiento para las importaciones de vinos en Colombia. Es importante destacar el incremento importante en el volumen de estas importaciones y el valor que estas representan, ya que en el año 2009 correspondieron a 14 mil toneladas, que en dinero fueron 35 millones de dólares.

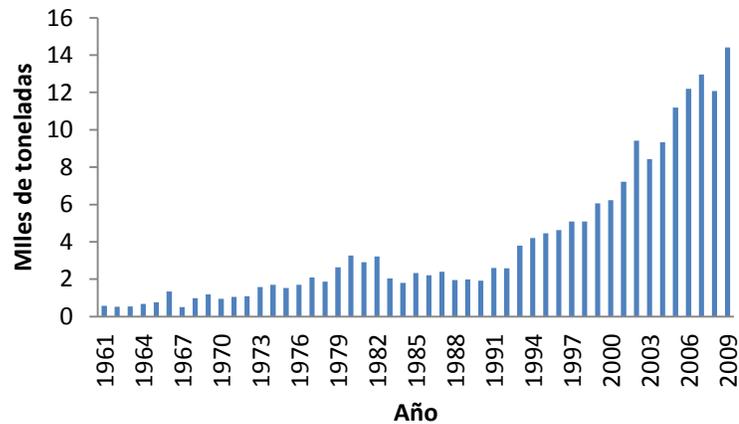


Figura C-5. Comportamiento de las importaciones de vino en Colombia en toneladas

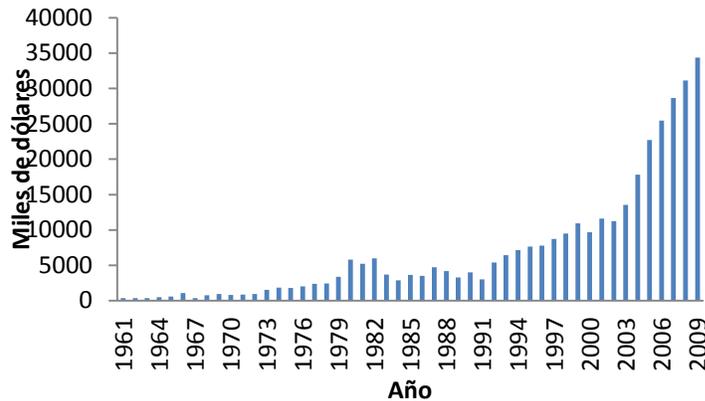


Figura C-6. Comportamiento de las importaciones de vino en Colombia en miles de dólares

Se debe tener en cuenta que para Colombia las exportaciones de vino no representan un papel importante.

4. Mercado del Hidromiel

De acuerdo con lo reportado por (Berry 2009), desde tiempos ancestrales hasta hoy en día, la producción de hidromiel existe alrededor de todo el mundo. Aunque hoy en día el número de mercados es menor, la hidromiel se puede encontrar en América del Norte (Canadá y los Estados Unidos), América del Sur (por ejemplo, Uruguay), Europa (por ejemplo, Italia, Irlanda, Polonia, Reino Unido), África (por ejemplo, Etiopía, Sudáfrica), y la región Asia-Pacífico (es decir, Australia y Nueva Zelanda). A pesar que el hidromiel sigue siendo un producto casero, existen consumidores en diferentes regiones el mundo que valoran este tipo de productos, pues generalmente tiene mejores características que otras bebidas alcohólicas comerciales, lo cual hace que este producto sea adecuado para pensar en su producción y exportación hacia algunos países.

Debido a que el vino de uva es líder al ser comparado con el hidromiel, es un reto grande la generación de valor con este producto y por ende las posibles ventas, pero es posible la apertura de nuevos mercados.

El hidromiel es generalmente vendido en licorerías, tiendas de vinos, en grandes mercados de hidromiel, como en Norte América y Europa, así como también en Australia y Nueva Zelanda.

Debido a que la demanda mundial de vinos se está incrementando, y a la preferencia por vinos de única y primera calidad, el hidromiel tiene un nicho importante al cual puede aspirar (Berry 2009). Según lo reportado por Euromonitor International, el incremento del valor en vino ha sido mayor al incremento de volumen de vino en todas las regiones del mundo; de 2002 a 2007, pues en volumen creció el 1%, mientras que el valor más del 7% (Berry 2009). También se espera que las ventas mundiales de vino en volumen crezcan aproximadamente un 10% entre 2005 y 2010, un aumento de alrededor de 28 billones de dólares. Se proyecta que los vinos que no son de uva se incrementen en volumen en 5% llegando a un volumen de ventas al año 2010 de \$ 21 mil millones para el año 2010. Se espera que disminuya la demanda de sake japonés y vino de arroz chino. Posiblemente los consumidores más jóvenes, y de clases alta y media de los mercados asiáticos, particularmente China, pueden actuar como motores importantes del crecimiento de la industria global del vino como el consumo de vinos (Berry 2009) que no sean de uva no tradicionales para ellos. En muchos mercados internacionales, el hidromiel sigue siendo parte de una industria artesanal o de productos caseros. Aunque el vino de uva todavía sigue siendo la variedad más popular de vino a nivel mundial, las preferencias y selecciones de vino son regionalmente diversas, pero genera la posibilidad e crear oportunidades para los productores de hidromiel en mercados internacionales.

4.1 Norteamérica

En Norteamérica, se pronostica un crecimiento continuo de la industria vinícola tanto en volumen como en ventas. Los consumidores de vino, hoy en día también tienen en cuenta los beneficios para la salud, demandan variedades de calidad superior, nuevos productos (por ejemplo, los vinos orgánicos y bajos en carbohidratos), embalajes dirigidos a las mujeres, entre otros. El incremento en los ingresos disponibles en las principales zonas urbanas de Norteamérica hace que probablemente se incremente un mercado de hidromiel, en particular en los Estados Unidos (Berry 2009). A pesar que el conocimiento generalizado del hidromiel es limitado, en Estados Unidos existen aproximadamente 60 fábricas productoras de hidromiel y 30 bodegas para su almacenamiento. El costo oscila entre 10,99 a 20 dólares por 750 ml, pero existen variedades de primera calidad se venden hasta en 70 dólares por 750 ml. En Estados Unidos se desarrolla un Festival internacional del hidromiel para productores de Estados Unidos, Canadá, Polonia, Dinamarca, Lituania y Sudáfrica, por

lo cual, se convierte en uno de los mercados más atractivos para la venta de hidromiel (Berry 2009).

4.2 Asia Pacífico y Sudeste Asiático

En cuanto a las regiones de Asia Pacífico y Sudeste Asiático, los consumidores asiáticos quieren tener un estilo de vida más occidental, lo cual es impulsado por los medios de comunicación en Norteamérica. Allí, el consumo de vino de arroz y sake está disminuyendo, y se están importando vinos de uva, los cuales están incrementando su popularidad; este cambio de hábitos de consumo, también impulsado por viajes de negocios internacionales hace que los asiáticos estén llevando a sus casas "La cultura del vino para beber". Este consumo también se está incrementando por todas las actividades de mercado y festivales (Berry 2009). En China hay una tendencia marcada hacia el consumo de bebidas de alta calidad, por lo cual es un nicho importante para que el hidromiel pueda ubicarse. Para las mujeres asiáticas, el sake y el vino de arroz se consideran opciones muy masculinas, por lo cual la producción de hidromieles especiados y frutales puede llegar a ser un importante nicho de mercado en Asia. En Indonesia, el consumo de vino de frutas y hierbas es el más popular, por lo cual la producción del hidromiel con hierbas y especias puede generar una alternativa adicional para este mercado potencial (Berry 2009).

4.3 Europa Occidental

En Europa, varios países son culturalmente e históricamente tradicionales en la producción de hidromiel, y todavía existen consumidores y mercado para este tipo de productos. Sin embargo, las diferencias en las oportunidades de mercado no existen entre las regiones de Europa oriental y occidental. Los consumidores europeos del Este, por ejemplo, al igual que sus homólogos asiáticos, están avanzando gradualmente hacia el consumo de vinos más "sofisticados" de uva en lugar de "anticuado" vinos de frutas, como los ingresos disponibles y estilos de vida occidentales siguen aumentando. En Alemania, el vino de frutas más popular (75% de las ventas) es el vino de manzana, seguido por cerezas y ciruelas. Por ello, un hidromiel que incluya una infusión de frutas, hierbas o especias puede tener una oportunidad de mercado importante allí. Alemania sigue siendo el mayor consumidor de vinos que no sean de uva en Europa occidental, pues representa el 84% del consumo en volumen y el 69% del total de ventas regionales (Berry 2009). En 2005 el volumen de vino ascendió a 98500 m³ (1,2 per cápita), y por un valor de \$ 428,9 millones de dólares. Italia es el segundo país consumidor de vinos que no son de uva, lo cual representa el 8% del

consumo de volumen total y el 9% de las ventas en dólares para la región. Dentro de las variedades más populares están los vinos de melocotón y albaricoque, así como el hidromiel, que generalmente se disfrutan como aperitivos y vinos de postre por consumidores de mediana edad y mayores. Los niveles de consumo en 2015 fueron de 9400 m³ (0,2 per cápita), por un valor de 55,3 millones de dólares (Berry 2009).

4.4 Europa Oriental

En Europa oriental, Polonia es el segundo mayor mercado para vinos que no son de uva. En 2005 el valor en ventas del consumo regional de este tipo de vinos fue 51,5 millones de dólares y el consumo de 138600 m³ (3,6 L per cápita). Los vinos de manzana, grosella y ciruela son muy populares en Polonia, por lo cual la comercialización de hidromieles con infusiones de frutas puede ser exitosa en este mercado. Sin embargo, los vinos de fruta se consideran como las bebidas de los segmentos de consumidores con menor poder adquisitivo, ya que sus precios son bajos. El incremento de la clase media en Polonia y el aumento de ingresos de los consumidores puede reforzar aún más esta percepción. Bielorrusia es el país que tradicionalmente ha consumido vinos de frutas, ya que no se cultiva uva. Su consumo anual es de 261 m³ de vinos de frutas, lo cual representa el 57% del total del consumo de esta región. Se espera que la demanda de este tipo de vinos se incremente, ya que el gobierno allí tiene previsto promocionar y desarrollar la industria de vinos de uva y otras frutas, por lo cual el hidromiel puede tener un nicho de mercado adecuado en esta región.

Otros mercados como Rusia, Ucrania y República Checa tienen bajos consumos de vino de frutas, (27,9, 19,6 y 5,6 m³ respectivamente). En estos países los vinos dulces de frutas y los vinos de grosellas son muy populares. En República Checa el consumo de hidromiel es tradicional, por lo cual cuenta con muchas empresas grandes de hidromiel, así como también con empresas familiares (Berry 2009).

4.5 Latinoamérica

En cuanto a Latinoamérica, Colombia, el mayor mercado de vino de manzana, lo cual representa el 49% del consumo en volumen y 24% en valor en dólares en el año 2005, es decir, 11,7 m³ y 15,9 millones de dólares. Estos valores se deben a que en Colombia existe la producción a bajo costo de este tipo de vino, el cual es consumido generalmente por consumidores de clase media y baja para ocasiones especiales (Berry 2009). Si se

desarrolla un hidromiel con precios competitivos con los vinos locales de manzana, puede resultar exitosa la producción y venta de hidromiel en Colombia.

Brasil experimentó el mayor crecimiento de volumen a nivel mundial de vinos de frutas desde 2002 hasta 2007 (30% de incremento), lo cual es significativamente más que la tasa anual global de 1% (Berry 2009). Probablemente este incremento se debe al interés en la cocina japonesa y la proliferación de restaurantes japoneses en el país. Se prevé que en este país los vinos de frutas pueden ser una alternativa no sólo para su consumo sino también para su producción local.

En Uruguay existe la producción artesanal y a pequeña escala de hidromiel. Normalmente se vende a 3.60 dólares por 750 ml, pero principalmente en botellas de un litro de 4,80 dólares (Berry 2009)

4.6 Medio Oriente y África

En el Medio oriente y África, importan algunos vinos, pero su industria de vinos es pequeña. Sin embargo, los Emiratos Árabes Unidos importan anualmente una considerable cantidad de vino de hielo canadiense (30000 dólares en 2008), sobre todo en Dubái, y se ubica 17 entre los mercados de exportación de vino de hielo de Canadá. Egipto, el puesto 21 de los destinos del vino de hielo canadiense, con exportaciones en 2005, por un valor de 7.541 dólares de las importaciones.

Se cree que el origen del hidromiel fue en África hace más de 20000 años, y sigue siendo parte importante de la cultura y tradición en países africanos. En Etiopía el vino de miel es llamado T'ej y sigue siendo la bebida nacional del país, pues es preferida por encima de los vinos de uva. Sin embargo, el T'ej es hecho en casa y no se vende comercialmente, pues cada familia tiene su receta propia, lo cual posiblemente puede limitar el mercado del hidromiel. Grahamstown, en Sudáfrica es sede de una planta productora de hidromieles que participa regularmente en el Festival Internacional de Hidromiel. Se prevé que el consumo de vino se incrementará en Suráfrica, Marruecos, Egipto e Israel, lo cual popularizará la cultura del vino y probablemente aumente la demanda del consumidor por productos de alta calidad de vinos internacionales, tales como el hidromiel.

4.7 Publicaciones acerca hidromiel

Tabla C-4. Publicaciones sobre hidromiel

Autores	Reporte
(Vidrih & Hribar 2007)	En este trabajo evaluaron tres tipos de hidromiel diferentes preparadas con mieles de castañas, limón y melón. Los tres tipos de hidromiel se prepararon inicialmente con 25°Brix, se llevó a cabo la fermentación a 15°C hasta que alcanzaron 14.2% de etanol (v/v). Se evaluó el perfil de alcoholes obtenido a lo largo de la fermentación, así como acetato de etilo. Se encontró que los panelistas prefirieron el hidromiel que tenía mayor cantidad de azúcares reductores que la que tenía menos azúcares.
(Sroka & Tuszyński 2007b)	En este reporte se evaluó el contenido de ácidos orgánicos del hidromiel a lo largo de la fermentación, utilizando el mismo tipo de levadura, para vino (Riesling), con relaciones miel:agua 1:3 y 1:2. Se utilizó como fuente de nitrógeno fosfato de amonio hidrogenado (0.4 g/l) y se adicionó ácido cítrico (0.25 g/l). A lo largo de la fermentación se evaluó el contenido de ácidos grasos utilizando cromatografía de gases, así como de ácido acético y succínico. Los mostos contenían ácidos grasos que se cree que pueden inhibir la fermentación, encontrándose como dominantes los ácidos decanoico, dodecanoico y octanoico. Se demostró que al inicio de la fermentación los ácidos predominantes fueron el acético y succínico, los cuales reducen el pH del mosto, mientras que el contenido de ácidos grasos cae entre un 70 y 80%; también disminuyen los ácidos fórmico, hexadecanoico y octadecanoico.
(M. Navrátil et al. 2001)	Este trabajo presenta la evaluación de la producción de hidromiel utilizando levaduras resistentes al etanol (de destilería) inmovilizadas en pectato de calcio, que tiene mayor resistencia mecánica que el alginato de calcio en un reactor continuo. Se encontró que este soporte puede ser más estable, y se logran tener menores tiempos de producción de hidromiel que al utilizar alginato de calcio como soporte. Este estudio permite establecer un avance en la forma de producción de hidromiel, incrementando la productividad de etanol y por ende, el tiempo de producción, haciendo que los costos disminuyan.

Autores	Reporte
(Kahoun, Rezková, et al. 2008)	<p>En este estudio se llevó a cabo la determinación de 25 compuestos fenólicos de diferentes muestras de hidromieles utilizando cromatografía líquida con un arreglo colorimétrico, y en el caso de hidroximetilfurfural, con detector UV. Se desarrolló un método el cual se optimizó en cuanto a la separación selectiva de cada uno de los compuestos fenólicos y la sensibilidad máxima en la detección electroquímica. Las muestras de hidromiel se diluyeron en la fase móvil 1:1 y 1:50 dependiendo de la concentración y filtradas. Se determinaron las concentraciones de estos compuestos en 50 muestras de hidromiel y se correlacionó con la concentración de hidroximetilfurfural. Se encontró ácido protocatéquico y ácido vanílico en el 98% de las muestras, y los compuestos presentes en el 10% de las muestras fueron catequina y ácido sinápico. Se encontraron agentes artificiales para mejorar el sabor, tales como vainiliina y etilvainillina, y el hidroximetilfurfural varió en concentraciones entre 2.47 y 158 mg/l. Se concluye que este método es aplicable para hidromiel, miel y otras muestras similares.</p>
(Mendes-Ferreira et al. 2010)	<p>La producción de hidromiel es un proceso que puede durar desde días hasta meses para finalizar. El proceso generalmente no es estandarizado, por lo cual los productos finales pueden tener diferentes características. En este trabajo se evaluó la producción de hidromiel utilizando una formulación de mosto que provea a la levadura para realizar una fermentación adecuada y al final, tener un producto de alta calidad. Primero, se centrifugó el mosto para reducir los sólidos insolubles, se pasteurizó a 65°C por 10 minutos y posteriormente se adicionó fuentes de nitrógeno y ácidos orgánicos. Se determinó que el perfil e intensidad de los aromas es mayor en los mostos a los que se le adicionó fosfato de diamonio, encontrándose una correlación entre la presencia de ésteres tipo acetato y etanoato, los cuales dan una sensación de mayor frutalidad en las bebidas fermentadas. Por otro lado, la adición de ácidos no tiene ningún efecto en la generación de etanol ni en la producción de diferentes compuestos aromáticos.</p>
(Main 2012); (The New York Times 2012);	<p>Se habla acerca de la historia del hidromiel, el cual nace en Grecia y se extiende por Europa oriental, teniendo nombres diferentes en cada una de las regiones donde es producido. En el New York Times se resaltan los eventos más importantes a nivel mundial en el caso de los hidromieles y su evaluación sensorial, haciendo una reseña sobre la importancia, su sabor, origen y las diferentes oportunidades de desarrollo que hay en este momento para este tipo de bebidas.</p>

Autores	Reporte
(Pereira et al. 2009)	Se reporta que el hidromiel es una bebida generalmente producida de manera casera, lo cual hace que los productores tengan muchos problemas con la uniformidad del producto y la generación de aromas no deseables debido a las levaduras que se utilizan, lo cual se debe posiblemente a la inhabilidad de la levadura a adaptarse al mosto y el estrés que pueden sufrir dependiendo de las características del mismo. Se trabajó con cinco tipos de levaduras aisladas de mieles y dos levaduras comerciales. Dichas levaduras se sometieron a estrés de presión osmótica, dióxido de azufre y alto contenido de etanol. Todas las levaduras presentaron el mismo comportamiento bajo estos estreses. Luego se tomaron dos levaduras aisladas y una comercial para evaluar el proceso de producción del hidromiel usando miel oscura y clara a las cuales se les adicionó dos suplementos, uno comercial y otro desarrollado en el laboratorio. Se encontró que una de las levaduras aislada de la miel presentó una fermentación adecuada, lo cual hace que tanto la composición de la miel como el tipo de microorganismo puede generar hidromieles de características adecuadas en un tiempo adecuado.
(Daniel & Schramm 1995); (McConnell & Schramm 2012)	Se da información tecnológica para la elaboración de hidromieles de diferentes tipos, así como consejos prácticos para el logro de un producto sensorialmente adecuado, teniendo en cuenta el tipo de miel, la temperatura de fermentación, el hidromiel deseado, entre otra información. Se presentan condiciones generales, la importancia de la miel, las condiciones de fermentación, adición de sustitutos.
(Wintersteen et al., 2005)	En este estudio evaluaron los efectos del tratamiento térmico en la capacidad antioxidante de hidromieles provenientes de dos tipos de mieles. Para ello utilizaron técnicas de cromatografía líquido para cuantificar los compuestos fenólicos, y se evaluó la capacidad antioxidante utilizando el método ORAC (oxygen radical absorbance capacity). Se evaluó la variabilidad de los componentes volátiles por cromatografía de gases. Se encontró que no hay influencia del tratamiento térmico en la capacidad antioxidante de los hidromieles evaluados y se encontró una relación fuerte entre la concentración total de los compuestos fenólicos con la capacidad antioxidante. Si se encontraron diferencias en el perfil aromático debido a los tratamientos térmicos realizados, por lo cual deben evitarse para perderlos en dicho tratamiento térmico.
(Qureshi & Tamhane, 1987; Qureshi, N, 1986)	Se evaluó la producción de hidromiel utilizando células inmovilizadas en alginato de calcio de Hansenula anómala y Saccharomyces cerevisiae, las cuales se empacaron en reactores para llevar a cabo la producción continua de hidromiel, el cual se operó por 110 días, obteniéndose una hidromiel adecuada en un tiempo corto, y con características deseables.

Autores	Reporte
(Roldán et al., 2011)	Evaluaron la producción de hidromiel adicionando polen como fuente de nitrógeno y otros micronutrientes, en concentraciones entre 10 y 50 g/l. Se encontró que la adición de polen mejoró las características sensoriales del hidromiel, así como la velocidad de fermentación. Adicionalmente, se encontró que un hidromiel adecuado debe tener características preferidas por el consumidor que la beberá.
(Barrios & Principal 2010)	En este trabajo se caracterizó un hidromiel artesanal mediante un análisis físicoquímico y sensorial, el cual fue elaborado con mieles provenientes de Peña, estado Yaracuy, Venezuela con el fin de garantizar la calidad organoléptica y grado de aceptación de este producto. Se realizó análisis sensorial con 32 panelistas no entrenados, quienes evaluaron el hidromiel artesanal y el no comercial y no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los dos productos.
(Chen et al. 2013)	Este es un artículo en el que se llevó a cabo un experimento preliminar dirigido a los apicultores locales. Tomaron miel diluida y añadieron diferentes tipos de levaduras a una necesidad hecha de una miel de la región de Taiwán. Describieron las diferentes metodologías aplicadas a saber cómo el avance de la fermentación se iba, como HPLC, cromatografía de gases, entre otros.
(Gomes et al. 2013)	En este artículo se estudia la variación de los diferentes parámetros de la fermentación de hidromiel mediante el uso de la metodología de superficie de respuesta. Ellos hicieron diferentes experimentos y finalmente encontraron las condiciones óptimas sobre la base de todas las respuestas eran una temperatura de 24 ° C y una concentración de nutrientes de 0,88 g / L. Sus resultados mostraron que los valores experimentales y los predichos fueron bastante similares. Por lo tanto, sus modelos obtenidos pueden ser utilizados para optimizar la producción de hidromiel.
	En este artículo se muestra una alternativa de inmovilización de superficie para la producción de diferentes tipos de hidromiel. Utilizaron cáscara de uva liofilizada como un soporte para las levaduras. Se dieron cuenta de la adición de las cáscaras causa diferentes efectos positivos, especialmente aumentando la concentración final de etanol, y se encontró que los efectos debidos difusión de transferencia de masa no son importantes cuando las células se encuentran en una superficie.

Autores	Reporte
(Menezes et al. 2013)	Este capítulo de libro está relacionado con el uso de la miel de abejas sin aguijón para preparar hidromiel. Se explica de una manera general el proceso de producción de hidromiel usando este tipo de miel, teniendo en cuenta la pasteurización como una operación importante a 65°C durante 5 minutos antes de comenzar la fermentación y después de terminar. Se recomiendan el uso de bentonita para aclarar la bebida al final de la fermentación.
(Pereira et al. 2014)	En este artículo se muestra una comparación entre las tres formas de la fermentación: mediante el uso de células libres, células inmovilizadas en alginato de calcio y células inmovilizadas mediante el uso de alginato de calcio y el quitosano. Se encontraron diferencias significativas especialmente en compuestos aromáticos generados durante la fermentación, pero no se encontraron diferencias en el tiempo, pH, acidez, porcentaje de etanol, etc. Recomendaron decidir la forma de fermentación relacionada con resultados sensoriales que los consumidores podrían evaluar diferentes prados.

D. Anexo: Aplicaciones de lengua electrónica

A continuación se presenta una recopilación de diferentes aplicaciones encontradas de la lengua electrónica.

Es importante resaltar el gran número de publicaciones en este tema, y dicho número se incrementa cada día, lo cual significa que es una temática que se encuentra en desarrollo debido a su aplicabilidad a diferentes matrices y procesos de interés.

En la Tabla D-1 se presentan algunas de las publicaciones relacionadas con los principios y conceptos básicos; en la Tabla D-2 se presentan algunas publicaciones relacionadas con los sensores utilizados y el funcionamiento de la lengua electrónica; en la Tabla D-3 se presentan artículos relevantes de muestras líquidas, agua y bebidas; en la Tabla D-4 se presentan artículos acerca del monitoreo de procesos biotecnológicos; en la Tabla D-5 se reportan artículos que tratan sobre leche y productos lácteos, y en la tabla D-6 artículos acerca de diferentes aplicaciones, tanto ambientales, como de otra índole.

Tabla D-1 Revisión de principios y conceptos básicos

Autores	Detalle
(Winqvist 2008)	Revisión que discute los principios básicos y las aplicaciones de las lenguas electrónicas voltamétricas. Se introduce el concepto de lenguas electrónicas y sensores de gustos, se describen los principios de medición tales como voltametría de pulso y reducción variable. Se presentan aplicaciones en diferentes industrias, tales como la de alimentos, ambiental, papel y agricultura.
(Viswanathan et al. 2009)	Revisión de los desarrollos recientes en biosensores electroquímicos aplicados a análisis de alimentos.
(Scampicchio, Davide Ballabio, et al. 2008)	Este es un artículo en el que se hace una revisión sobre las lenguas electrónicas basadas en sensores amperométricos y aplicados en análisis de alimentos. Se muestra la importancia tanto del tipo de sensores como del análisis multivariado que hay que realizar para que efectivamente este tipo de herramientas sean útiles en el análisis de alimentos, bebidas y monitoreo de agua. Se encontró que dentro de las aplicaciones reportadas por varios autores, se encuentra el análisis para identificación de vinos de acuerdo con la región, el tipo de uva y la cosecha de la cual provienen.
(Prien 2007)	En este artículo se hace una revisión de las diferentes tecnologías que se han desarrollado para producir sensores in situ desde el 2002 hasta el 2007. Se presenta el potencial de tecnologías y posibles sensores futuros, tales como características espectroscópicas y absorción óptica para la determinación de concentraciones de nitratos, determinación de oxígeno oceánico, componentes volátiles disueltos y análisis in-situ de diferentes analitos.
(Vlasov et al. 2008)	En este artículo se hace una revisión de los diferentes principios en los que se basan las lenguas electrónicas, así como los diferentes tipos de lenguas electrónicas y algunas aplicaciones, específicamente enfocada al análisis y clasificación de medios líquidos, su análisis cuantitativo e importancia a nivel industrial, en especial para la aplicación de sabores en alimentos y medicamentos.

Autores	Detalle
(Suzuki 2008)	En este artículo se resalta la importancia de los sensores de gusto artificial y la filosofía que hay tras de ellos. Se menciona que este tipo de sensores pueden utilizarse con el fin de determinar las relaciones que pueden existir entre el desarrollo de bebidas y consumidores.
(Zeravik et al. 2009)	Este artículo hace una revisión en la que se comparan diferentes clases de sensores bioelectrónicos. Se discuten los diferentes principios de las lenguas voltamétricas con aplicaciones en alimentos y ambientales. Se presentan diferentes avances en el estudio de los sensores bioelectrónicos, así como el potencial en el análisis de vinos y la importancia de los métodos de evaluación e interpretación.
(Zhou et al. 2010)	En este artículo se hace la revisión de la lengua electrónica universal necesaria para determinar el sabor en alimentos. Se menciona la importancia de los métodos de reconocimiento de patrones para poder realizar diferentes aplicaciones en diferentes matrices alimenticias. Se menciona que el enfoque en la quimiometría, y especialmente en los métodos de análisis multivariado son herramientas fundamentales para lograr tener una lengua electrónica universal.
(Latha & Lakshmi 2012)	En este artículo se presentan aspectos relevantes que destacan la utilización de lenguas electrónicas en paneles de medicamentos debido a su flexibilidad y a las restricciones que la FDA presenta para las pruebas sensoriales de medicamentos con paneles sensoriales tradicionales.

Tabla D-2 Sensores y funcionamiento de lengua electrónica

Autores	Detalle
(Pioggia, et al., 2007a; Pioggia, et al., 2007b)	Prototipo de lengua electrónica basada en la medición de la impedancia con múltiples sensores compuestos. Los autores presentaron un prototipo de lengua electrónica basada en la medición de la impedancia con múltiples sensores compuestos. Se fabricaron cinco diferentes sensores, los cuales actuaban a través de tres diferentes mecanismos de reconocimiento: un nanotubo de hidrogel de carbono (CNT) cargado, dos polímeros comerciales cargados con carbón negro y dos polímeros conductores. Desde su descubrimiento en la década de 1990, se han estudiado los CNT, debido a su actuación, mecánica y detección de propiedades.
(Rachid et al. 2010)	Dispositivos en los que se emplea la voltamperometría, en los que se mide la corriente con potenciales fijos. Cuando se utiliza voltamperometría en medios complejos, sin embargo, se obtienen espectros bastante complejos, y la interpretación de los datos puede ser difícil. Sin embargo, los voltamogramas contienen una gran cantidad de información y para extraerla, la utilización de métodos de calibración multivariada ha sido de creciente interés y utilización.
(Winqvist, 1999; Winqvist et al., 1997)	Lengua electrónica basada en voltamperometría, la cual consiste en una serie de los diferentes electrodos de trabajo en una configuración de tres electrodos que se aplican la voltamperometría de pulso. Esta lengua electrónica fue capaz de clasificar diversos líquidos, como jugos de fruta y bebidas sin gas, y seguir los procesos de envejecimiento de leche.
(Winqvist et al., 2000)	Lengua electrónica híbrida, la cual trabaja sobre la base de una combinación de determinaciones potenciométricas, voltamperométricas y conductividad. En este artículo se utilizaron diferentes leches fermentadas con el fin de hacer un experimento modelo que permitiera su clasificación. La información que se obtuvo en este experimento se trató a través del procesamiento de datos multivariados PCA y redes neuronales ANN.

Autores	Detalle
Vlasov, 2000, Winqvist et al., 2008	Reportan que a pesar de que la lógica detrás de la aplicación de los sensores de baja selectividad se basa en una analogía con la organización biológica del sistema olfativo y el gusto en los mamíferos, se puede decir que a medida que la lengua electrónica clasifica propiedades particulares en los sistemas complejos, los resultados no necesariamente se relacionan con la sensación humana, sino que puede relacionarse con otras propiedades de calidad en una muestra
(Gutés et al., 2007)	Determinación de ácido ascórbico, úrico y acetaminofén con una lengua electrónica voltamétrica automatizada, con un sistema de análisis de inyección secuencial (SIA) acoplada a una red neuronal artificial y una herramienta quimiométrica para el modelamiento y análisis del sistema.
(Bratov et al., 2010)	En este artículo se destaca el desarrollo de sensores de iones basados en membranas poliméricas que se aplican para determinaciones analíticas. Se diferencian los diferentes tipos de sensores y arreglos de sensores, así como los principios de transducción tales como electrodos selectivos de iones con membranas poliméricas, electrodos de contacto sólidos, electrodos de alambres recubiertos, transistores y sensores potenciométricos de luz dirigible.
(Kumar 2006)	En este trabajo se evaluó el diseño de un dispositivo similar a una lengua de mamíferos utilizando membranas poliméricas y lípidos. Se evaluó la discriminación de los cinco sabores básicos utilizando muestras modelo, y luego mezclas que incluyeran todos los sabores. Se encontró que esta lengua pudo encontrar los límites superiores e inferiores de los datos encontrados, y relacionarlos con la sensación de gusto en diferentes tipos de muestra.

Autores	Detalle
(Cetó et al. 2013)	<p>En este trabajo se presenta la comparación de diferentes alternativas numéricas de procesamiento de datos obtenidos a través de lenguas electrónicas voltamétricas con el fin de reducir la alta dimensionalidad de las matrices de respuesta. Se utilizó análisis de componentes principales, transformada rápida de Fourier, transformada wavelet discreta, y diferentes alternativas de modelación (regresión de componentes principales, de regresión por mínimos cuadrados parciales, en múltiples sentidos parciales de regresión por mínimos cuadrados, las redes neuronales artificiales); se emplearon datos obtenidos a través de un biosensor aplicado en la detección de compuestos fenólicos.</p>
(Campos et al. 2012)	<p>Este trabajo propone una metodología para el diseño de matrices de impulsos aplicados en las técnicas de clasificación y cuantificación basados en el uso de pulsos en lenguas electrónicas voltamétricas. Como problema modelo se diseñó un procedimiento para predecir los niveles de ferrocianuro, usando una lengua electrónica voltamétrica con un conjunto de electrodos nobles de oro, platino, iridio, y rodio. Se aplicó el análisis multivariado basado en mínimos cuadrados (PLS) técnicas parciales para la gestión de datos y modelos construcción predictiva. Se probaron varios conjuntos de datos para poder proponer la metodología planteada.</p>
(Alcañiz et al. 2012)	<p>En este trabajo se presenta un instrumento que permite llevar a cabo la aplicación de técnicas voltamétricas y de impedancia. Se realizaron estudios de voltametría utilizando un total de ocho electrodos de trabajo que se encuentran en un cilindro de acero inoxidable utilizado en el mismo tiempo que tanto el cuerpo del sistema. Con el fin de aplicar el instrumento, se aplicaron técnicas voltamétrica a bebidas cola y utilizando técnicas de PCA se encontró la clasificación de las bebidas.</p>

Autores	Detalle
(del Valle 2012)	Es un trabajo de revisión en el que se describen los trabajos más recientes relacionados con sistemas electroquímicos de lengua electrónica, resaltando la utilización de sensores en serie y herramientas quimiométricas para manipular la compleja información generada. Se describe el uso de redes neuronales artificiales como la variante de procesamiento de datos. Se utilizan diferentes ejemplos de aplicación utilizando casos seleccionados del Grupo de sensores y biosensores de la Universidad Autónoma de Barcelona.

Tabla D-3 Muestras líquidas, agua y bebidas

Autores	Detalle
(Moreno et al., 2006)	Se utilizó una lengua electrónica integrada por sensores químicos selectivos para iones. Se clasificaron 13 marcas diferentes de agua mineral. Aplicaron varios métodos de reconocimiento de patrones, como el análisis de agrupamiento jerárquico (HCA) y análisis de componentes principales (PCA). Se demostró que la lengua electrónica utilizada fue capaz de diferenciar entre clases así como entre marcas de aguas. Finalmente, lograron construir un modelo de clasificación basado en los datos experimentales, lo cual convirtió a este instrumento en una herramienta de clasificación rápida y a bajo costo.
(Vlasov et al., 1997)	Lengua electrónica con base en una matriz de electrodos de vidrio, combinados con una rutina de reconocimiento de patrones, para la medición de los metales en el agua del río, o en combinación con poli cloruro de vinilo para evaluación de bebidas.
(Toko, 1998b), (Ivarsson 2001), (Esbensen et al., 2004), (Toko, 2000)	Sensores de gusto sobre membranas a base de lípidos / polímero en un electrodo de varios canales con aplicaciones en clasificación de café y leche

Autores	Detalle
(Legin, 1997)	Evaluación analítica con una lengua electrónica capaz de diferenciar diferentes grupos de bebidas tales como té, café jugos, gaseosas y cervezas y monitorear la calidad de jugos de fruta durante su almacenamiento y envejecimiento. Menciona también que los dispositivos potenciométricos se mide todo a través del comportamiento de diferentes electrodos de referencia y de trabajo. Se han creado lenguas electrónicas con base en una matriz de electrodos de vidrio, combinados con una rutina de reconocimiento de patrones, para la medición de los metales en el agua del río, o en combinación con poli (cloruro de vinilo) para la degustación de las membranas de bebidas.
(H. Men et al., 2009)	Diseño de un sistema de lengua electrónico basado en sensores selectivos de iones aplicado a la clasificación de agua mineral, con detección rápida de iones H ⁺ , Na ⁺ , Ca ⁺⁺ y K ⁺ , constituyéndose en una herramienta de bajo costo, aplicable al control de calidad y con respuesta en tiempo real.
(Martina et al., 2007)	Evaluación de electrodos de oro y platino, y un electrodo modificado con platino y poli(3,4-etilenedioxitiofeno) para determinar su capacidad discriminativa aplicada a frutas y jugos de fruta.
(Hong Men et al., 2008)	Utilización de una red neuronal y algoritmos genéticos para analizar y controlar señales obtenidas a través de una lengua electrónica de múltiples sensores para identificación de iones aplicados a diferentes tipos de aguas minerales.
(Di Natale 1997)	Utilización de una lengua electrónica para caracterización de aguas contaminadas con diferentes tipos de iones. Se logró realizar diferenciación de aguas con diferentes contaminantes, utilizando un arreglo de sensores que identificaban siete tipos diferentes de iones. Se utilizó análisis de componentes principales y mínimos cuadrados para evaluar y analizar los datos obtenidos a partir del sistema utilizado.

Autores	Detalle
(Verrelli & Di Natale 2008)	Aplicación de lengua electrónica en mediciones ambientales, aplicando diferentes tipos de sensores recubrimientos y técnicas de validación y procesamiento estadístico de datos para la obtención de condiciones adecuadas de un sistema capaz de ser aplicado a monitoreo ambiental.
(Sehra 2004)	En este artículo se presenta el diseño y la realización de un sistema de detección tipo lengua electrónica que se basa en una superficie horizontal de doble corte de onda acústica (SH-SAW), el cual puede diferenciar los diferentes sabores básicos en líquidos. Para ello, se fabricaron sesenta sensores diferentes, con los cuales se llevó a cabo la determinación de los sabores básicos: amargo, salado, ácido y dulce en muestras sintéticas. Se encontró relación entre la teoría electroacústica y propiedades de los líquidos, tales como la conductividad y permitividad relativa
(Lavigne et al. 1998)	Aplicaciones de lenguas electrónicas descritas recientemente basadas en la absorción de la luz, con aplicación para mezclas de azúcares simples con este dispositivo a valores de pH diferentes
(Men et al. 2005)	Se desarrolló una lengua electrónica portátil con un sensor potenciométrico de luz multidireccional y dos sensores electroquímicos. Esta lengua se enfocó en el análisis de hierro (II), hierro (III), cromo (VI) para aplicarse en aguas residuales y detección de metales pesados, teniendo en cuenta técnicas voltamétricas de diferentes clases y métodos para detección simultánea de iones y metales pesados.
(Nieh et al. 2009)	Se desarrolló un sistema potenciométrico de inyección de flujo para determinar el grado de fermentación de té basado en los potenciales redox de infusiones de té, las cuales se extrajeron con buffer de fosfato. Este sistema pudo identificar el grado de fermentación de muestras comerciales de té utilizando electrodos de platino y carbono.

Autores	Detalle
(Bhattacharyya et al. 2012; Ghosh et al. 2012)	<p>En estos artículos los autores se enfocan en la determinación de parámetros de la calidad del té. En el primer caso, los autores utilizan electrodos de diferentes metales nobles con el fin de caracterizar el licor negro de té, encontrando una relación adecuada de las mediciones realizadas con la lengua electrónico y un espectrofotómetro UV-Vis.</p> <p>En el segundo caso, los autores expresan la dificultad de la determinación de parámetros de calidad del té, los cuales son determinados generalmente por catadores expertos. Utilizan una lengua electrónica voltamétrica con el fin de llevar a cabo voltametría de pulso y cinco electrodos de trabajo de oro, iridio, paladio, platino, y rodio. Los datos se transforman utilizando wavelet discreta (DWT) y luego se procesan utilizando el análisis de componentes principales (PCA) y discriminante lineal análisis (LDA) para la visualización de las agrupaciones subyacentes. Finalmente, se utilizaron redes neuronales con el fin de establecer las correlaciones entre las respuestas de los catadores expertos y los análisis obtenidos mediante el uso de la lengua electrónica.</p>
(Smyth & Cozzolino 2013)	<p>Los autores hacen una revisión de las diferentes técnicas que existen para predecir el aroma en diferentes bebidas utilizando combinación de nariz electrónica, lengua electrónica, espectrofotometría, entre otras técnicas. Resaltan la importancia de la utilización de análisis multivariado para poder generar modelos predictivos, y mencionan que dentro de las limitaciones que se encuentran están el número de experimentos realizados y la particularidad de cada una de las matrices analizadas.</p>
(Liu et al. 2012)	<p>En este estudio se utilizó una lengua electrónica potenciométrica, en la cual se analizaron bebidas de naranja de diferentes marcas. También se determinaron diferentes índices fisicoquímicos de calidad con el fin de determinar su relación con las señales obtenidas por la lengua electrónica. Llevando a cabo diferentes técnicas de análisis multivariado de datos se encontró que la lengua electrónica tiene una buena capacidad de discriminación entre las diferentes bebidas de naranja.</p>

Tabla D-4 Monitoreo de procesos biotecnológicos

Autores	Detalle
(Deisingh et al., 2004), (Scampicchio, et al., 2008), (Rudnitskaya & Legin, 2008)	Aplicaciones en análisis de alimentos que pueden tener la nariz y la lengua electrónica, así como también, la utilización de lengua electrónica para la evaluación de parámetros ambientales en agua, como lo son la presencia de cationes como amonio, potasio y sodio, así como el seguimiento en procesos biotecnológicos
(Legin et al., 2004)	Utilización de una lengua electrónica basada en sensores sensibles potenciométricos cruzados aplicados al medio de crecimiento de <i>Aspergillus niger</i> y monitoreo del consumo de nutrientes clave a lo largo de la fermentación.
(Esbensen et al., 2004; Legin et al., 2004);	Se empleó la lengua electrónica con el fin de monitorear procesos biotecnológicos, teniendo en cuenta diferentes concentraciones de ácidos orgánicos, estableciendo la relación del perfil de aminoácidos con las señales obtenidas a través de la lengua electrónica.
(Men et al., 2010)	En este trabajo se utilizó una lengua electrónica para identificar dos tipos de bacterias oxidativas de metales pesados, empleando redes neuronales, mínimos cuadrados parciales y análisis de componentes principales. Este tipo de técnicas hace que los costos de análisis sean bajos y amplía el uso de este tipo de herramientas no sólo para análisis de alimentos, sino en este caso, para identificación de dos tipos de bacterias.

Tabla D-5 Leche y productos lácteos

Autores	Detalle
(Dias et al., 2009)	Se empleó una lengua electrónica para determinar los sabores básicos en muestras estándar con el fin de aplicarse a la adulteración de leche de cabra utilizando leche de vaca, un problema que existe a nivel industrial. Se encontró que este sistema analítico es de bajo costo, permite el análisis de muestras de leche de cabra y de vaca en diferentes proporciones y pueden convertirse en una herramienta útil para la evaluación de la calidad de leche de cabra a nivel industrial.

Autores	Detalle
(Ciosek et al., 2006)	Mediciones de conductividad e impedancia para la determinación de la solubilidad, constantes de disociación y algunas otras propiedades de una muestra solución. Se realizó la aplicación para contenido de grasa de la leche
(Vlasov, 2000), (Winquist, 1999), (Dias et al., 2009)	Lengua electrónica para la evaluación de los productos lácteos, discriminación entre leche de vaca y cabra, procesos en línea, detección de adulteración y producción de yogurt.
(Paixão & Bertotti 2009)	Se reporta un nuevo proceso de elaboración de una lengua electrónica teniendo en cuenta la integración de electrodos necesarios para la aplicación que se requiera. Se utilizaron electrodos de oro y cobre modificados con azul de Prusia, combinando análisis estadístico para la determinación de la sensibilidad y estandarización de las señales obtenidas al evaluar leche con diferentes condiciones de pasterización, contenido de grasa y adulteración con peróxido de hidrógeno. Se determinó que este instrumento fue capaz de diferenciar entre todos los tipos de muestras evaluadas.

Tabla D-6. Otras aplicaciones

Autores	Detalle
(Gil et al. 2010)	Utilización de una lengua electrónica basada en la utilización de electrodos metálicos y grafito para el análisis de lomo de cerdo almacenado a lo largo del tiempo y la relación de su respuesta con análisis de pH, conteo microbiológico y concentración de ATP asociada a la degradación de compuestos de la carne.
(Gil et al. 2008)	Utilización de alambres simples de oro como alternativa a los sensores electroquímicos comúnmente utilizados aplicados al seguimiento de la vida útil de pescado en almacenamiento
(Woertz et al., 2010)	Utilización de una lengua electrónica comercial aplicada al desarrollo de enmascaramiento de sabor amargo en medicamentos, analizando las características de las señales obtenidas a través de los diferentes sensores de la lengua comercial.

Autores	Detalle
(Peres et al. 2011)	Se utilizó y aplicó una lengua electrónica de treinta y seis membranas poliméricas con el fin de detectar gliadinas, proteínas responsables de la intolerancia al gluten en las personas celiacas. A través de un modelo lineal de once membranas se logró diferenciar semicuantitativamente y clasificar muestras exentas de gluten, sin gluten, con bajo contenido de gluten y con gluten, variando el contenido de estas gliadinas. Este instrumento puede considerarse una herramienta preliminar para el control de calidad en este tipo de alimentos.
(Cozzolino et al., 2011)	En este trabajo se revisó la importancia de la construcción de modelos de calibración para predecir propiedades químicas y físicas de frutas y bebidas de frutas. Se presentan combinaciones de métodos de análisis multivariados con datos obtenidos a través de determinaciones analíticas con espectroscopía por fluorescencia, lengua electrónica y nariz electrónica.
(Legin, 1999)	Se desarrolló una lengua electrónica teniendo en cuenta sensores químicos no específicos, métodos de reconocimiento de patrones y características analíticas de sensores de iones. Se encontró que este sistema pudo identificar sustancias orgánicas y realizar mediciones sin utilizar un electrodo de referencia.
(Beullens et al. 2008)	Se reportan dos lenguas electrónicas como técnicas rápidas para analizar el sabor de tomates provenientes de diferentes cultivos. Las lenguas electrónicas emplearon fueron comerciales (Astree y Alpha MOS). Se emplearon técnicas de análisis multivariado para clasificar los tipos de tomate con base en sus características de sabor, y se concluyó que cada una de las lenguas evaluadas es más sensible y clasifica mejor de acuerdo con un tipo de sabor: dulce, sabor umami, acidez y nivel de sal.
(Lavigne et al. 1998)	Se encuentran aplicaciones de lenguas electrónicas descritas recientemente basadas en la absorción de la luz. Consisten en un dispositivo de carga acoplada (CCD) en combinación con productos químicos indicadores en una resina. Se analizaron mezclas de azúcares simples con este dispositivo a valores de pH diferentes.

Autores	Detalle
(Bataller et al. 2012)(Braga et al. 2009)(Oliveira et al. 2012)(Kirsanov et al. 2013)	Estos autores reportan la determinación de pesticidas y diferentes sustancias tóxicas utilizando técnicas electroquímicas, las cuales facilitan la determinación de este tipo de sustancias in situ.
(Apetrei & Apetrei 2013)(Da Silva et al. 2012)(Kutyła-Olesiuk et al. 2013)(Campos et al. 2013)	Estos autores utilizaron lenguas electrónicas con el fin de caracterizar el momento de recolección de uvas para la preparación de vinos, la clasificación de aceite de oliva, las características de manzanas deshidratadas y las características sensoriales de bebidas de soya. En todos los casos se llevaron a cabo diferentes determinaciones tradicionales en las matrices seleccionadas y se emplearon técnicas de análisis estadístico multivariado para determinar la correlación de las variables obtenidas a través de la lengua electrónica con las demás variables determinadas.
(Cetó, Céspedes, Pividori, et al. 2012)	Determinó el comportamiento de diferentes antioxidantes en solución acuosa individual y mezcla de ellos. Se encontró que con la utilización de la lengua electrónica se pudo llevar a cabo la identificación de la presencia de las diferentes sustancias evaluadas.

E. Anexo: Evaluación de cinética sensorial de hidromiel tradicional

A continuación se presenta el formulario utilizado para la realización del análisis sensorial con el pánel entrenado de 8 personas.

FORMATO PARA EVALUACIÓN SENSORIAL APLICADA A CINÉTICA DE HIDROMIELES

Código de panelista:

Ustedes evaluarán muestras correspondientes a diferentes muestras a lo largo del tiempo de fermentación para la obtención de hidromieles. Encontrar  desde la muestra del día 1, la cual contiene la máxima cantidad de carbohidratos sin etanol, hasta la muestra final, la cual tiene pocos carbohidratos y la mayor cantidad de etanol.

Por favor, evalúe las muestras que tiene a disposición, evaluando los diferentes aspectos requeridos.

Código de muestra

Parámetro de calidad	Grado de calidad						
PARÁMETROS OLFATIVOS							
Intensidad de olor:	1	2	3	4	5	6	7
Complejidad de olores:							
Intensidad de aroma:	1	2	3	4	5	6	7
Complejidad de aromas:							
Intensidad de dulce	1	2	3	4	5	6	7

Intensidad de ácido	1	2	3	4	5	6	7
Intensidad de alcohol	1	2	3	4	5	6	7
Intensidad de amargo	1	2	3	4	5	6	7
Defectos de olor y aroma	Láctico (exceso)			Picado		Huevos podridos	
	Moho			Pegamento		Lías (sedimento)	
	Herbáceo (exceso)			Oxidado		Sulfuroso	
	Corcho			Geranio		Cocido	

PARÁMETROS VISUALES							
Limpidez:	Turbio			Mate		Limpio	
	Brillante						
Matiz:	Amarillo claro			Amarillo		Amarillo quemado	
	Ocre			Café		Ámbar	
Intensidad del color:	Débil			Ligero		Medio	
	Fuerte						
Lágrimas /fluidez	Cortas			Medias		Largas	

PARÁMETROS GUSTATIVOS							
Gustos elementales:	<i>Dulzor</i>	Seco		Semiseco		Dulce	
	<i>Acidez</i>	Plana		Vivo/Fresco		Excesiva	
	<i>Amargo</i>	Bajo		Medio		Alto	
	<i>Salado</i>	Bajo		Medio		Alto	
Intensidad de sabor:	Débil			Moderado		Potente	
Astringencia:	Baja			Media		Alta	
Cuerpo y equilibrio:	1	2	3	4	5	6	7
Aristas:							
Persistencia aromática global:	1	2	3	4	5	6	7
Comentarios generales de la muestra							

F. Anexo: Selección y adquisición del sistema de gusto artificial

Comercialmente existen diferentes proveedores de sistemas electroquímicos utilizados para llevar a cabo mediciones que utilicen diferentes técnicas, sensores, sustancias de referencia y soluciones.

Dentro de estas opciones se encuentran las empresas Dropsens, de España y Palsmsens, de Holanda, las cuales venden diferentes alternativas para estos sistemas.

En Colombia no existen representantes de ninguna de las dos empresas, por lo cual fue necesario establecer el contacto directo y establecer ventajas y desventajas de las soluciones que proponía cada una de ellas. En la tabla F-1 a continuación se presenta el análisis comparativo, inicialmente para cada una de las empresas.

Tabla F-1 Comparación de empresas proveedoras de insumos para el sistema de gusto artificial

	
España	Holanda
Fabricante de sensores, celdas, potenciostatos	Fabricante de potenciostatos y accesorios
No distribuye otros sensores; presenta exclusividad de conectores, sensores, celdas de flujo, programas	Distribuidor de diferentes sensores: BST, BVT, University of Florence, Rusens
Soporte técnico permanente	Soporte técnico permanente
Precios más altos	Precios más bajos

Los insumos requeridos para poder tener un sistema son el potenciostato, los conectores, sensores y celdas de flujo. En la tabla F-2 se presentan la comparación de costos de los diferentes costos implicados en el proceso de adquisición de estos insumos. Se puede

observar que los insumos, y especialmente, el potencióstato ofrecido por Palmsens es mucho más flexible y cuesta menos; ofrece cuatro canales los cuales pueden usarse simultánea e independientemente, permitiendo hacer diferentes tipos de análisis al tiempo. Adicionalmente, los sensores ofrecidos cuestan menos al ser adquiridos a Palmsens, así como las celdas de flujo; en el único costo que es más alto es el envío, pues el equipo venía de Holanda y no de España. Sin embargo, el costo total de los insumos es menor en Palmsens, por lo cual se decidió adquirirlos.

Tabla F-2. Comparación costos y observaciones para adquisición del potencióstato

Equipo	Dropsens €	Palmsens €	Observaciones
Potencióstato	6990	5900	En el potencióstato, Dropsens ofrece 2 aparatos para 1 sensor cada 1. Palmsens ofrece 1 que permite la utilización de 4 simultáneamente
Sensores	932,5	346	Los sensores, son más costosos por unidad en Dropsens. No incluyen los cables dentro del costo de los potencióstatos
Celdas de flujo	1090	756	Las celdas de flujo son menos costosas en Palmsens
Envío	100	220	El costo del envío varía debido a la ubicación de cada proveedor España (Dropsens) y Holanda (Palmsens)
Total	7900	7222	El costo total es más asequible para Palmsens, garantizando un sistema adecuado para el montaje de la Lengua Electrónica. Aunque Dropsens plantea un descuento y sólo cobrar el potencióstato, éste no es tan versátil como el que propone Palmsens

El sistema adquirido cuenta con un sistema de conexión, kit para test de funcionamiento, cable USB para transmitir información al computador.

El sistema se ubicó en el laboratorio de la planta de vegetales del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Este sistema cuenta con dos programas para adquisición de datos: Multitrace y PSTrace, los cuales permiten una interfase gráfica fácil de manejar, y permite la exportación de los datos a Excel, para posterior uso y transformación.

Las celdas de flujo adquiridas para llevar a cabo el análisis empleando un sistema de flujo presentan unas tuberías de diámetro muy pequeño: 0.65 mm de diámetro externo y 0.52 de diámetro interno; adicionalmente, su flujo máximo permitido es de 200 μ L por minuto, haciendo necesario pensar a futuro en la compra de una bomba que permita controlar este flujo.

G. Anexo: Resultados de diferentes sensores para soluciones de sustancias puras

En las figuras G-1 a G-3 se observan los resultados obtenidos para cada uno de los sensores evaluados y las diferentes muestras; éstas son diferentes; sin embargo, las señales obtenidas para muestras analizadas con el mismo sensor permiten establecer que las señales obtenidas para cada una de las muestras son diferentes, lo cual fue confirmado por un análisis ANOVA Kruskal Wallis con 95% de confiabilidad. Por lo tanto, estos resultados observados llevan a concluir que es posible llevar a cabo la diferenciación de estas sustancias utilizando los tres sensores evaluados. En la tabla G-1 se presentan los resultados para el análisis estadístico para cada una de los sensores evaluados, donde se puede observar que las muestras para cada sensor provienen de poblaciones diferentes.

Tabla G-1. Resultados prueba ANOVA Kruskal Wallis con 95% de confiabilidad

Sensor	Chi-Cuadrado	DF	Prob>Chi-Square
Grafito	177,92513	15	$6,22743 \times 10^{-30}$
Platino	2580,13171	15	0
Oro	72,1847	11	$4,68608 \times 10^{-11}$

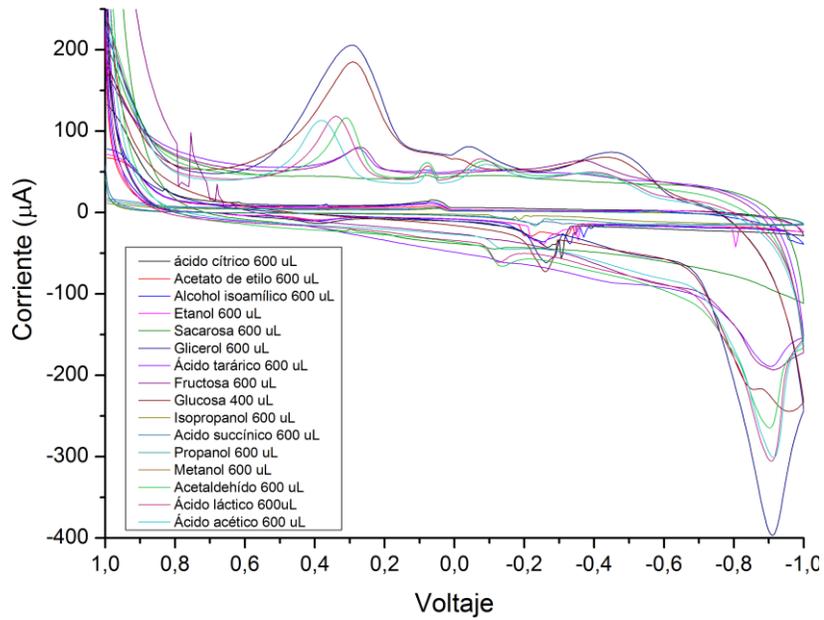


Figura G-1 Comportamiento del sensor AC1W4R1 (grafito), cloruro de potasio 0.2M, y diferentes muestras analizadas

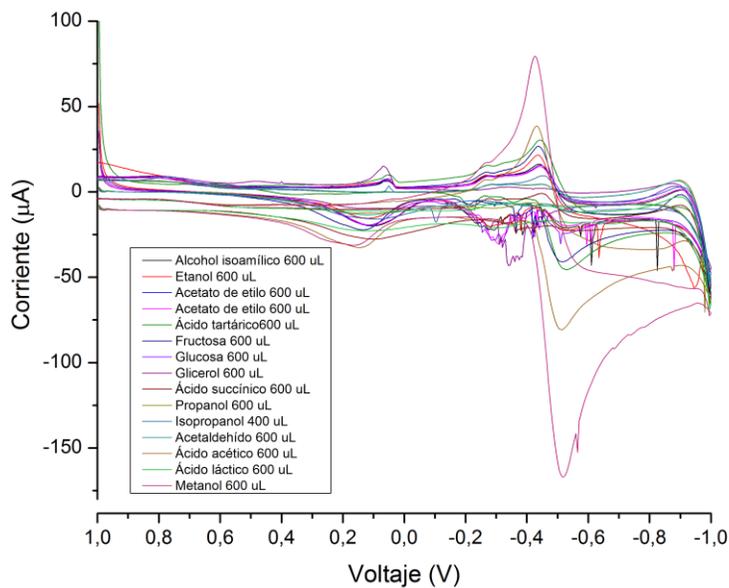


Figura G-2 Comportamiento del sensor AC1W2R1 (platino), cloruro de potasio 0.2M, y diferentes muestras analizadas

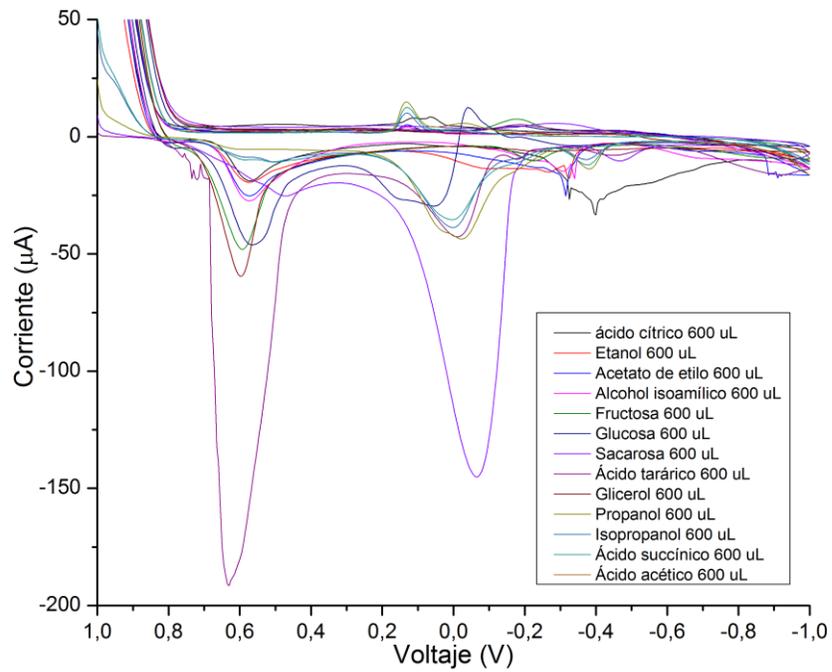


Figura G-3 Comportamiento del sensor AC1W1RS (oro) y diferentes muestras analizadas