



Universidad Pública de Navarra
Nafarroako Unibertsitate Publikoa

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA AGRONÓMICA Y
BIOCIENCIAS**

***NEKAZARITZAKO INGENIARITZAKO ETA BIOZIENTZIETAKO GOI
MAILAKO ESKOLA TEKNIKOA***

***EVALUACIÓN DE LA TECNOLOGÍA DE INFRARROJO CERCANO
EN LA DETECCIÓN DE ADULTERANTES EN LA MIEL***

.....

presentado por

IVÁN GARAYOA PISANO

.....

MÁSTER UNIVERSITARIO EN TECNOLOGÍA Y CALIDAD EN
LAS INDUSTRIAS AGROALIMENTARIAS

*UNIBERTSITATE MASTERRA NEKAZARITZAKO ELIKAGAIEN INDUSTRIETAKO
TEKNOLOGIAN ETA KALITATEAN*

SEPTIEMBRE, 2020

AGRADECIMIENTOS

Y después de 3 años, llegó el final de mi segunda etapa académica universitaria...ha sido duro, sin duda, pero al mismo tiempo gratificante, interesante y llena de momentos que recordaré siempre. Han sido muchos los madrugones, especialmente duros e intensos en invierno, las horas y horas delante del ordenador buscando y analizando referencias bibliográficas para los diferentes trabajos, momentos de nerviosismo para superar el pánico escénico de las presentaciones orales en clase, etc. Durante todo este tiempo, hemos pasado por inundaciones e incendios en la Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y Biociencias y pandemias globales de coronavirus, pero al final me quedo la sensación de llevarme una excelente experiencia vivida, una oportunidad de actualizar y aumentar mis conocimientos, conocer nueva gente, nuevos puntos de vistas y sobre todo la satisfacción personal de haberlo conseguido....con la ayuda de mucha gente.

En primer lugar quiero agradecer a mi tutora del TFM, Ainara, por toda su ayuda y apoyo. Recordaré durante mucho tiempo esas calurosas tardes de verano en el laboratorio de la Escuela, con las caras tapadas por las mascarillas y las manos pegajosas de miel...que mejor excusa para evitar las tardes de piscina, ¿verdad?.

También quiero agradecer a Iker, apicultor, productor y emprendedor artesano de la marca de miel LOREZ-LORE, por facilitarme la miel pura de milflores necesaria para la elaboración del presente estudio, sin duda, la protagonista principal de este acto.

Por último, quiero agradecer a mi familia por todo su esfuerzo y apoyo moral y emocional aun cuando mis ánimos decaían. En especial a ti Ainhoa, muchas gracias por apoyarme en cada momento que lo necesitaba y por todo el esfuerzo extra que has tenido que hacer para que yo pudiera sacar adelante este máster. Y a nuestros maravillosos hijos, Telmo, Ibai y Gael, que cada vez que os veo sois mi principal fuente de motivación para alcanzar cualquier meta u objetivo de la vida.

MUCHAS GRACIAS A TODOS

RESUMEN

La industria agroalimentaria en general y el sector de producción de la miel en particular se enfrenta constantemente al gran reto de ofrecer productos de calidad y seguros para el consumidor. El presente trabajo evalúa la tecnología de infrarrojo cercano (NIR) en combinación con técnicas quimiométricas para la detección de adulterantes en la miel. Se analizaron 180 muestras de miel adulteradas con dos adulterantes diferentes: mezcla de azúcares fructosa:glucosa (en proporción 1:0,85 p/p) y miel de baja calidad. Se analizó para cada adulterante 4 niveles de adulteración: 0%, 1%, 5% y 10%. Se tomaron los espectros de infrarrojo cercano de todas las muestras y estos se procesaron mediante el empleo de técnicas quimiométricas. El modelo PLS-DA desarrollado clasificó correctamente el 90,63% de las muestras de miel adulteradas con fructosa:glucosa y el 79,63% de las muestras de miel adulteradas con miel de baja calidad. Los resultados obtenidos demuestran que la tecnología de infrarrojo cercano es una herramienta efectiva en la detección de los adulterantes en la miel y por lo tanto puede ser empleada como método de control rutinario por la industria agroalimentaria para la lucha contra el fraude de la miel.

Palabras clave: NIRS, quimiometría, miel, adulteración, PLS-DA.

ABSTRACT

The agri-food industry in general and the honey production sector in particular are constantly facing the great challenge of offering quality and safe products to consumers. The present work evaluates near infrared (NIR) technology in combination with chemometric techniques for the detection of adulterants in honey. With this purpose, 180 samples of honey adulterated with two different adulterants were analysed: with a fructose: glucose mixture (in the ratio: 1:0.85 w/w) and, with low quality honey. Four levels of adulteration were analysed for each adulterant: 0%, 1%, 5% and 10%. The near-infrared spectra of all the samples were acquired and processed using chemometric techniques. The PLS-DA model developed was able to correctly classify 90.63% of the honey samples adulterated with the fructose: glucose mixture and 79.63% of the samples adulterated with low quality honey. The results obtained show the potential of the near-infrared technology as an effective tool for detecting adulterants in honey and therefore, it could be used as a routine control method by the agri-food industry to deal with honey fraud.

Keywords: NIRS, chemometrics, honey, adulteration, PLS-DA

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN – PALABRAS CLAVE / ABSTRACT – KEY WORDS	Pag. 03
ÍNDICE DE FIGURAS	Pag 07
ÍNDICE DE TABLAS	Pag 08
1.- INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	Pag. 09
1.1.- LA MIEL NATURAL	Pag. 09
1.1.1.- DEFINICIÓN Y COMPOSICIÓN	Pag. 09
1.1.2.- PRODUCCION Y PROCESO DE ELABORACIÓN DE LA MIEL	Pag. 09
1.1.3.- CARACTERIZACIÓN FÍSICO QUÍMICA DE LA MIEL	Pag 14
1.1.4.- ESTABILIDAD DE LOS COMPONENTES QUÍMICOS DE LA MIEL	Pag 15
1.1.5.- ALTERACIÓN DE LOS PRINCIPIALES COMPONENTES DE LA MIEL	Pag 17
1.2.- ADULTERACIÓN DE LA MIEL	Pag 20
1.2.1.- TIPOS DE ADULTERACIÓN DE LA MIEL	Pag. 20
1.2.2.- MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN DE ADULTERANTES	Pag 23
1.3.- PLANTEAMIENTO DE LA CUESTIÓN. OBJETIVO	Pag 27
1.4.- ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO	Pag 28
1.4.1.- BASES TEÓRICAS	Pag 28
1.4.2.- INSTRUMENTACIÓN	Pag 29
1.4.3.- QUIMIOMETRÍA	Pag 33
1.4.3.1.- ANÁLISIS CUANTITATIVO	Pag 33
1.4.3.2.- ANÁLISIS CUALITATIVO	Pag 36

1.5.- APLICACIONES DE LA TECNOLOGÍA NIRS EN LA DETECCIÓN DE ADULTERACIÓN EN LA MIEL	Pag 37
2.- MATERIALES Y MÉTODOS	Pag 38
2.1.- MUESTRAS	Pag 38
2.1.1.- MIELES	Pag 38
2.1.2.- ADULTERANTES	Pag 38
2.2.- INSTRUMENTACIÓN	Pag 39
2.2.1.- EQUIPO ESPECTROSCOPIA INFRARROJO CERCANO (NIRS)	Pag 39
2.3.- PROCEDIMIENTO DE ADULTERACIÓN	Pag 40
2.4.- ANÁLISIS QUIMIOÉTRICO. DESARROLLO DEL MODELO DE CLASIFICACIÓN	Pag 42
2.4.1.- ANALISIS DE DATOS SUPERVISADO: PLS-DA	Pag 42
2.4.2.- VALIDACIÓN Y PRECISIÓN DEL MODELO	Pag 43
3.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	Pag 45
3.1.- INTERPRETACIÓN DE ESPECTROS NIR	Pag 45
3.2.- ANÁLISIS PLS-DA	Pag 47
4.- CONCLUSIONES	Pag 57
5.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	Pag 59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de la producción de miel por continentes en 2018. (FAOSTAT, 2018).	Pag. 5
Figura 2. Diagrama de los principales países productores de miel en 2018 (FAOSTAT, 2018). ..	Pag. 6
Figura 3. Diagrama de flujo del proceso de elaboración de la miel.	Pag. 8
Figura 4. Tipos adulteración de miel y líneas de investigación detección (Naila et al., 2018). .	Pag. 16
Figura 5. Diagrama resumen de los principales adulterantes de la miel y de los métodos de detección actuales.	Pag. 21
Figura 6. Espectro electromagnético (López-Maestresalas, 2016).	Pag. 23
Figura 7. Modos de medición NIRS: (a) reflectancia, (b) transmitancia, (c) transflectancia y (d) interactancia.....	Pag. 25
Figura 8: Muestras de miel pura empleada en el estudio.	Pag. 33
Figura 9. (a) Fructosa y glucosa empleados como adulterante tipo 1. (b) Miel de baja calidad empleado como adulterante tipo 2.	Pag. 34
Figura 10. Espectrofotómetro Brimrose Luminar 5030.	Pag. 35
Figura 11. (a) 10 Muestras de miel adulterada con fructosa:glucosa al 1%. (b) 10 Muestras de miel adulterada con miel de baja calidad al 1%.	Pag. 36
Figura 12. Espectros NIR de miel adulterada con fructosa:glucosa.	Pag. 40
Figura 13. Espectros NIRS de miel adulterada con miel de baja calidad.	Pag. 41
Figura 14. Resultados del modelo PLS-DA para los cuatro grupos de adulteración con fructosa:glucosa. Estimación para el grupo Adulteración 0%.	Pag. 46
Figura 15. Resultados del modelo PLS-DA para los cuatro grupos de adulteración con fructosa:glucosa. Estimación para el grupo Adulteración 10%.	Pag. 47

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Número de muestras (n), % varianza explicada (v), número de variables latentes (LV) y %CC obtenidos en los modelos PLS-DA de muestras de miel. Pag. 43

Tabla 2. Matriz de confusión para el modelo PLS-DA para grupo de muestras adulteradas con fructosa:glucosa. Pag. 44

Tabla 3. Matriz de confusión para el modelo PLS-DA para grupo de muestras adulteradas con miel de baja calidad. Pag. 45

Tabla 4. Valores de sensibilidad y especificidad obtenidos en cada modelo de predicción para cada grupo de muestras. Pag. 49

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1.1.- LA MIEL NATURAL

1.1.1.- DEFINICIÓN Y COMPOSICIÓN

La miel, según se define en el Real Decreto 1049/2003, de 1 de agosto, por el que se aprueba la Norma de calidad relativa a la miel (BOE núm. 186, de 5 de agosto de 2003), es la sustancia natural dulce producida por la abeja *Apis mellifera* a partir del néctar de plantas o de secreciones de partes vivas de plantas o de excreciones de insectos chupadores presentes en las partes vivas de plantas, que las abejas recolectan, transforman y combinándolas con sustancias específicas propias, depositan, deshidratan, almacenan y dejan en colmenas para que madure. Según su origen, la miel se puede clasificar como miel de flores o miel de néctar (si procede del néctar de las flores) o miel de mielada (si procede en su mayor parte de excreciones de insectos chupadores de plantas (hemípteros) presentes en las partes vivas de las plantas o de secreciones de las partes vivas de las plantas. La miel de flores se puede clasificar en monofloral (predomina en ella el polen de una determinada especie botánica) o multifloral (cuando se compone del néctar de flores de varias especies botánicas). El porcentaje requerido para clasificar una miel como monofloral de una determinada especie botánica varía en función de la especie de que se trate; desde un 10 % para mieles de azahar y romero hasta un 70 % en las de eucalipto.

A lo largo de la historia, hay multitud de referencias documentadas que dejan constancia de la gran importancia y de los numerosos usos que se han dado a la miel, convirtiéndose en ocasiones en un producto indispensable y de primera necesidad. En algunos lugares, la miel se usa para hacer bebidas alcohólicas como el vino de miel y aguamiel (cultura maya) y en algunas zonas de África la cerveza de miel es una bebida tradicional y popular.

A la miel se le atribuyen numerosas propiedades medicinales que han sido objeto de estudio en diferentes trabajos científicos, algunos de los cuales destacan la miel por su poder energético, contra la anemia, dinamizante, laxante, hepatoprotector, antiséptico, antibacteriano y cicatrizante. Muchas de estas propiedades se explican por los factores físicos y factores químicos relacionados con la presencia de sustancias inhibitoras, sustancias volátiles como flavonoides, sustancias antioxidantes, ácidos fenólicos, vitaminas y minerales.

Desde el punto de vista de su composición, la miel es un alimento que contiene cerca de 200 sustancias (Escuredo, Míguez, Fernández-González, & Carmen Seijo, 2013) pero que básicamente se puede describir como una solución acuosa (14-22%) concentrada de azúcares, especialmente de glucosa (22-40%), fructosa (28-44%) y sacarosa (0,2-7%), que contiene además proteínas y aminoácidos (0,2-2%), ácidos orgánicos, enzimas y vitaminas (0,5-1%), minerales (0,5-1,5%), cenizas (0,2-1%), sustancias antioxidantes y aromáticas, pigmentos, cera y polen.

La composición fisicoquímica y las características organolépticas de las mieles están directamente relacionadas con las especies botánicas de las que proceden y de las condiciones climáticas y edafológicas del lugar donde se recolectan; así como de las prácticas y procedimientos de extracción, manipulación y almacenamiento llevados a cabo por el apicultor.

1.1.2.- PRODUCCIÓN Y PROCESO DE ELABORACIÓN DE LA MIEL

En el mundo se producen 1.864.249 Tm de miel al año (producción promedio entre los años 2016 a 2018). La producción anual de miel por continentes se distribuye de la siguiente manera: Asia produce 886.066 Tm/año (47,53%); Europa produce 406.298 Tm/año (21,80%), América produce 341.564 Tm/año (18,32%); África produce 199.492 Tm/año (10,70%) y Oceanía produce 30.829 Tm/año (1,65%) (Figura 1). Durante el año 2018, China fue el país de mayor producción de miel, con una producción anual de 446.900 Tm. A continuación le siguen Turquía con una producción anual de 114.113 Tm; Argentina con 79.468 Tm; Irán con 77.567 Tm y en el quinto lugar se encuentra Ucrania con una producción anual de 71.279 Tm. España, con una producción anual de 36.394 Tm., es el decimosegundo país mayor productor de miel (FAOSTAT, 2018) (Figura 2).

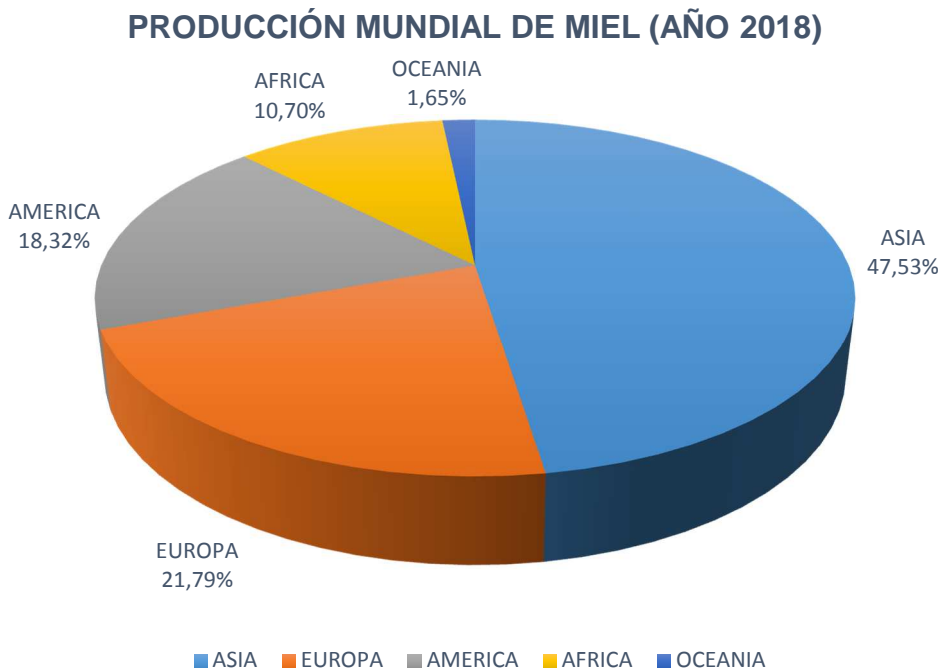


Figura 1. Diagrama de la producción de miel por continentes en 2018. (FAOSTAT, 2018).

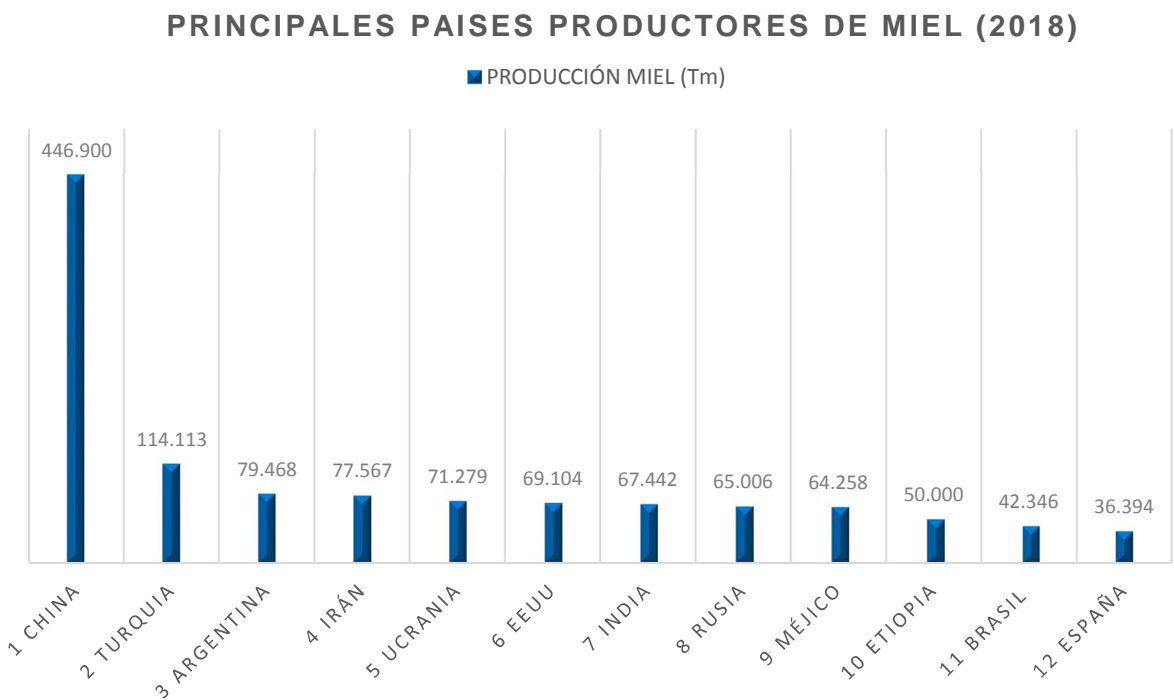


Figura 2. Diagrama de los principales países productores de miel en 2018 (FAOSTAT, 2018)

La miel es un alimento cuya preparación comienza en la planta, la cual produce el néctar principalmente en la base del interior de la flor. La abeja recolectora, guarda el néctar recolectado del interior de la flor en "el buche" durante un tiempo transformando la sacarosa que contiene el néctar en glucosa. Al regresar al panal saca el néctar y se lo pasa a otra compañera (esta vez una obrera) que lo guarda en su buche. La abeja obrera alarga la trompa y saca una gotita de miel manteniéndola unos segundos en el exterior, después la vuelve a guardar y saca otra gotita para repetir este proceso de 80 a 90 veces para eliminar parte del agua y así convertir con sus enzimas el néctar en miel.

Esta miel debe madurar y eliminar agua, para lo cual las obreras introducen en una celda la gotita y la extienden haciendo que esté lo más expuesta al aire posible. La colmena de encuentra a unos 35° C aproximadamente, lo cual colabora a deshidratar esta miel "inmadura" junto con la entrada de aire fresco forzada por las abejas con el batir de sus alas. Terminado el proceso de deshidratación, la mezcla habrá perdido un 80% del agua. Las abejas van llenando las celdas con las gotas de miel que han deshidratado en otros compartimentos y que se encuentran en estado óptimo de humedad y cuando éstas se llenan las tapan con una capa de cera virgen para que se conserve intacta, lo que también se denomina "opercular". Este proceso finaliza la parte de la fabricación de la miel destinada a las abejas.

La extracción de la miel se realiza cuando los panales están operculados, es decir, cuando la miel está "madura". A este proceso se le llama "desopercular" y consiste en cortar o retirar la tapa de las celdillas (también llamada "opérculo") para hacer que la miel salga. El aseguramiento de la calidad del producto extraído, comienza con la selección de los cuadros que se encuentran completamente operculados, por lo que se hace necesario controlar los niveles de humedad de los cuadros y asegurar niveles óptimos en la humedad del producto madurado, evitando la extracción de miel a partir de cuadros con cría. Mieles con humedad superior al 22% generan fermentaciones indeseables y pérdida final del producto en condiciones de almacenamiento prolongado, con posibles nucleaciones y formación de hidroximetil furfural e incremento en la actividad del agua con elevación del contenido en levaduras, hongos y mohos entre otros.

Los cuadros desoperculados se colocan en el interior de unos recipientes donde se extrae la miel por medio de un proceso de centrifugado en frío de forma que los panales queden limpios para que las abejas vuelvan a utilizarlos. Una vez se extrae la miel, se filtra en frío lo que exige más tiempo, aunque resulte mejor colarla tibia y todavía mucho mejor caliente pero a

una temperatura no mayor a 50°C porque en tales condiciones sufre transformaciones que la desvalorizan. Posteriormente se deja reposar entre 6 y 7 días para después decantar estas mieles de forma que se puedan eliminar todas las impurezas antes de su envasado. Una vez filtrada se procede a su envasado.

Sin embargo, es importante enfatizar que la miel normalmente no se comercializa en su estado natural. Al contrario, suele sufrir un proceso de industrialización. Esto se debe principalmente a que los consumidores demandan un producto fluido no cristalizado y, aunque la miel cruda recién cosechada se encuentra en estado líquido, se cristaliza con mayor o menor velocidad. La cristalización depende de numerosos factores, como el origen (botánico y geográfico), la temperatura, el contenido de humedad y el contenido de azúcar. La fabricación industrial de miel (Figura 3), incluye dos etapas de estabilización de la miel que involucran tratamientos térmicos: licuefacción (aprox. 55°C) para asegurar que sea suficientemente líquido para manejar; y pasteurización (aprox. 80°C) para destruir la levadura que puede causar una fermentación no deseada durante la vida útil del producto y disolver los núcleos de cristalización que hacen que la miel se solidifique, asegurando que la miel permanezca en su forma líquida el mayor tiempo posible.

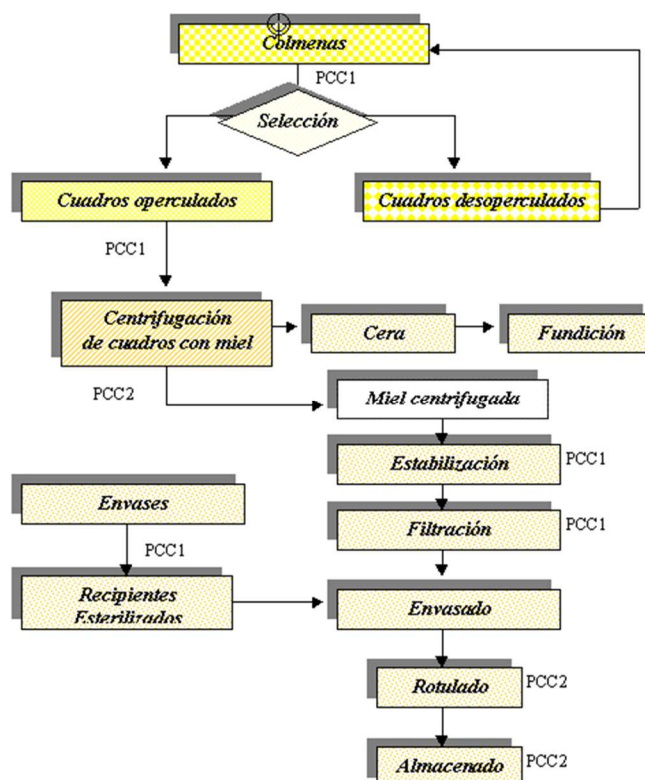


Figura 3. Diagrama de flujo del proceso de elaboración de la miel (Salamanca G., G., 1999).

1.1.3.- CARACTERIZACIÓN FÍSICO QUÍMICA DE LA MIEL

Son varios los ámbitos de caracterización de la miel: Caracterización física (índice de refracción, rotación específica, densidad, color, etc.); caracterización química (composición química, contenido de humedad, actividad de agua, pH, acidez libre, acidez láctica y acidez total, HMF, actividad diastásica, etc.); caracterización microbiológica (Aerobios mesófilos, Enterobacterias, Clostridium, hongos y levaduras), caracterización botánica (caracterización palinológica) y caracterización organoléptica o sensorial (cristalización, fluidez, aroma, sabor, aceptabilidad, etc). El presente trabajo se centrará exclusivamente en el ámbito de la caracterización fisicoquímica de la miel ya que estos son los parámetros que mayor significación tienen sobre la calidad, estabilidad y adulteración de la miel.

La identificación y contenido de polen ha sido usado tradicionalmente como parámetro para la caracterización y control de calidad de las mieles, sin embargo, con este indicador solo no siempre se puede garantizar esto. Son muchos los autores que han publicado artículos científicos a escala mundial que sugieren el empleo de análisis con criterios fisicoquímicos (pH, contenido en agua, acidez, composición química, conductividad eléctrica, etc) para la adecuada caracterización de las mieles.

El contenido de agua o humedad, la medición del pH, la acidez libre total y acidez láctica, la actividad de las enzimas diastasa e invertasa, el contenido en hidroximetilfurfural (HMF), la conductividad eléctrica, la actividad de agua, en contenido en azúcares (glucosa, fructosa y sacarosa) y el contenido en prolina (proteína) fueron los parámetros analizados en un estudio realizado sobre los parámetros físicos y químicos para la diferenciación entre la miel de origen botánico cítrico y eucalipto en Andalucía (España) (Serrano, Villarejo, Espejo, & Jodral, 2004).

En un trabajo realizado en Brasil sobre la composición química, estabilidad y autenticidad de la miel fueron analizados los siguientes parámetros fisicoquímicos para identificar y determinar la calidad de las mieles: la humedad, la actividad del agua, la acidez libre, el pH, el contenido en cenizas, la conductividad eléctrica, el color, el contenido en hidroximetilfurfural y la actividad de la diastasa (Da Silva, Gauche, Gonzaga, Costa, & Fett, 2016).

Existen en la actualidad numerosos estudios a escala mundial llevados a cabo para analizar los parámetros fisicoquímicos de diferentes mieles tanto en cuanto a su origen como en calidad. El estudio de estos parámetros está encaminado principalmente a que mediante la caracterización fisicoquímica de la miel se pueda determinar el origen de la misma, su estado de conservación, su grado de adulteración y su calidad. Además, determinar el valor de estos parámetros resulta imprescindible para conocer si se encuentran dentro de los estándares definidos por las Normas de Calidad de la miel (B.O.E. 2003) y otras normas de carácter internacional (Codex Standard for Honey, 2001), indicando así si son aptas para su comercialización. Del análisis y comparación de diversos estudios publicados recientemente se concluye que los parámetros básicos e imprescindibles para una correcta caracterización fisicoquímica de la miel son: la composición química (contenido en azúcares, proteínas y aminoácidos, ácidos orgánicos, vitaminas y minerales), el color, la humedad, la actividad del agua (A_w), la conductividad eléctrica, el pH, la acidez libre y el contenido en hidroximetilfurfural (HMF).

1.1.4.- ESTABILIDAD DE LOS COMPONENTES QUÍMICOS DE LA MIEL

Los distintos compuestos químicos que forman parte de la miel (azúcares, proteínas, aminoácidos, vitaminas, compuestos fenólicos, etc.), están sometidos a procesos de actividad enzimática específicas presentes en la miel, tratamientos de alta temperatura y periodos de almacenamiento de larga duración lo que conlleva a que se produzcan cambios y degradaciones de dichos compuestos en nuevos productos como furanos, aminoácidos, alcoholes, nuevos compuestos fenólicos y nuevos compuestos volátiles. Así mismo, la alteración de los componentes de la miel pueden verse afectados por la producción de reacciones secundarias, como la *reacción de Maillard* (catalizadas por el incremento de la temperatura), cuando los compuestos derivados de furanos son sometidos a calentamiento o sufren largos periodos de almacenamiento (Da Silva et al., 2016).

Reacción de Maillard: Es un conjunto muy complejo de reacciones químicas que traen consigo la producción de melanoidinas coloreadas que van desde el amarillo claro hasta el café muy oscuro e incluso el negro, además de diferentes compuestos aromáticos. Para que las transformaciones tengan lugar, son necesarios un azúcar reductor (cetosa o aldosa) y un grupo amino libre, proveniente de un aminoácido o una proteína. La reacción de Maillard puede ocurrir durante el calentamiento de los alimentos o durante el almacenamiento

prolongado. Los productos mayoritarios de estas reacciones son moléculas cíclicas y policíclicas, que aportan sabor y aroma a los alimentos, aunque también pueden ser cancerígenas como la acrilamida. La reacción se acelera en condiciones de alcalinidad y alcanza un máximo de velocidad a pH 10. Los alimentos de humedad intermedia (actividad de agua con valores entre 0,6 y 0,9) son los más propensos. El tipo de aminoácido involucrado es decisivo, pues los aminoácidos serán más reactivos conforme aumente el tamaño de la cadena y tengan más de un grupo amino. Los azúcares reductores que más favorecen la reacción de Maillard son, primero, las pentosas y, luego, las hexosas; asimismo, las aldosas actúan más fácilmente que las cetosas, y los monosacáridos son más eficientes que los disacáridos. Las fases de la reacción de Maillard son:

1.- Fase Inicial: Se produce la unión entre los azúcares y los aminoácidos. Se obtiene una glucosamina.

2.- Fase intermedia: En esta fase se produce la deshidratación de azúcares formándose las reductonas o dehidrorreductonas y tras esto se sobreviene la degradación de Strecker, donde se generan aldehídos o cetonas (fácilmente detectables por el olfato). Paralelamente, se producen un conjunto de reacomodamientos y deshidrataciones que dan también compuestos volátiles.

3.- Fase final: Se produce la formación de los conocidos pigmentos oscuros que se denominan melanoidinas como consecuencia de la polimerización de muchos de los compuestos formados en la fase intermedia.

Estos cambios en la composición química de la miel que se producen de forma natural durante el periodo de almacenamiento o como consecuencia del procesamiento térmico son debidos principalmente a reacciones químicas que incluyen la deshidratación, la fermentación y la oxidación. Por ejemplo, el 5-hidroxiacetilfurfural (5-HMF), que es un producto intermedio de reacción de Maillard, puede formarse cuando la miel se somete a un tratamiento térmico o un largo tiempo de almacenamiento (Tornuk et al., 2013), volviéndose volátil y tóxica, dependiendo de su concentración. Al mismo tiempo, el 5-HMF también puede formarse por la deshidratación de los azúcares en un ambiente ácido, como la miel.

La reacción de Maillard conlleva una reducción en el valor nutricional del alimento, ya que se produce una destrucción de aminoácidos esenciales, como el grupo lisina ϵ -amino, que

reacciona con los azúcares y otros aminoácidos como la L-arginina y la L-histidina; sin embargo, no hace que los alimentos sufran el pardeamiento u oscurecimiento.

1.1.5.- ALTERACIÓN DE LOS PRINCIPALES COMPONENTES DE LA MIEL

➤ Azúcares

Cuando la miel se somete a proceso de calentamiento térmico o se almacena durante mucho tiempo, las pentosas y hexosas se descomponen en una enolización lenta y una rápida eliminación de tres moléculas de agua para formar compuestos no deseables como los furanos. Los principales furanos formados son el furfural, que se deriva de pentosas, y el 5-hidroximetilfurfural (5-HMF), derivado de hexosas como la glucosa y la fructosa. Estos son los principales productos de degradación de los azúcares y su presencia en los alimentos suele estar relacionada con reacciones de pardeamiento no enzimático, es decir, la reacción de Maillard, como consecuencia de la degradación del azúcar en un medio ácido y la caramelización. Estos furanos se han utilizado como marcadores para el tratamiento térmico de los alimentos (Moreira, Maria, Pietroluongo, & Trugo, 2010).

➤ Proteínas

Bajo condiciones de almacenamiento prolongados y por técnicas de procesamiento mediante calor, los alimentos ricos en azúcares o aminoácidos como la miel llevan a la formación de compuestos indeseables debidos a la reacción del grupo carboxílico en el extremo reductor de los azucares y los grupos amino libres de los aminoácidos y proteínas, reacción de Maillard, que ocurre como un paso inicial hacia la formación de compuestos de Amadori, que luego forman melanoidinas. Los compuestos de Amadori se derivan de los aminoácidos lisina, prolina, ácido γ -aminobutírico y arginina, aminoácidos que suelen estar presentes en la miel (Iglesias et al., 2006). En el estudio realizado por Iglesias et al., 2006, analizaron los aminoácidos libres presentes en diferentes muestras de miel sin pasteurizar y sometidas a diferentes periodos de almacenamiento a temperatura ambiente. Los autores encontraron que el contenido de los aminoácidos: ácido aspártico, β -alanina y prolina aumentó durante los primeros 6 meses de almacenamiento. La concentración de prolina disminuyó después de 6 meses de almacenamiento, mientras que la concentración de ácido aspártico disminuyó después de 12 meses de almacenamiento. La concentración de β -alanina no cambió entre 6 y 24 meses. Este resultado puede sugerir que mientras β -alanina está involucrada en la reacción de Maillard, su reactividad es menor que la de otros aminoácidos. El aumento de

ácido aspártico y prolina durante los primeros meses de almacenamiento puede explicarse por la presencia de enzimas como la proteasa y/o peptidasa en la miel, porque estos aminoácidos están presentes en el polen. La concentración de aminoácidos libres disminuyó durante los primeros nueve meses de almacenamiento, mientras que no se observó una diferencia significativa en los 15 meses de almacenamiento.

➤ **Ácidos Orgánicos**

La acidez de la miel se debe principalmente a los ácidos orgánicos cuya cantidad es inferior al 0,5% y puede variar ampliamente. Numerosos estudios científicos han determinado que la acidez contribuye al sabor de la miel, la estabilidad frente a los microorganismos, el aumento de las reacciones químicas y las actividades antibacterianas y antioxidantes. El ácido glucónico, resultante de la acción de la glucosa oxidasa de la miel sobre la glucosa, proporciona la mayor contribución a la acidez y está en equilibrio con la gluconolactona.

El ácido libre es uno de los parámetros más importantes para el control de calidad de la miel que se incluye dentro de los criterios de composición europeos para este producto alimenticio y cuyo contenido está regulado por las Normas de Calidad de la miel (Codex Standard for Honey, 2001).

Cavia, Ferna, & Huidobro (2007) evaluaron la evolución de la acidez libre de 35 mieles españolas que no habían sido calentadas durante 30 meses. La acidez libre se mantuvo prácticamente constante durante los primeros 15 meses de almacenamiento, con una ligera tendencia a aumentar. Después de 20 meses, la mayoría de las muestras de miel mostraron un aumento constante en la acidez libre, proporcionada por los ácidos libres en la miel. Muchos autores han informado sobre el aumento de la acidez con el tiempo, así como durante la fermentación, ya que los azúcares y los alcoholes de la miel se transforman en ácidos por la acción de las levaduras de miel (Cavia et al., 2007).

➤ **Vitaminas**

Las condiciones de almacenamiento y el procesamiento de los alimentos causan la pérdida de vitaminas, que varía ampliamente según el tipo de alimento y una serie de parámetros específicos (por ejemplo, temperatura, oxígeno, luz, humedad, pH). En el caso de la miel, se ha demostrado que la filtración comercial reduce su contenido de vitaminas debido a la eliminación casi completa del polen. Otro factor que causa la pérdida de vitaminas en la miel es la oxidación del ácido ascórbico por el peróxido de hidrógeno producido por la glucosa oxidasa (Ciulu et al., 2011).

➤ **Minerales**

Los elementos minerales, en contraste con las vitaminas y los aminoácidos, no están sujetos a degradación por exposición al calor, la luz, los agentes oxidantes, el pH extremo u otros factores que afectan a los nutrientes orgánicos. En esencia, los minerales son indestructibles, un hecho muy importante, ya que estos minerales son componentes de enzimas esenciales para varias reacciones metabólicas en el cuerpo humano y también desempeñan un papel importante en las funciones corporales, razón por la cual se hace indispensable su incorporación a través de la dieta.

➤ **Compuestos fenólicos**

Los compuestos fenólicos son un grupo químicamente heterogéneo, con aproximadamente 10,000 compuestos, que se agrupan en diferentes clases según su estructura química básica. Se pueden dividir en no flavonoides (ácido fenólico) y flavonoides (flavonas, flavonoles, flavononas, flavanoles, antocianidinas, isoflavonas y calconas). Los principales componentes funcionales de la miel son los flavonoides y contribuyen significativamente a la actividad antioxidante total de la miel (son compuestos que actúan como antioxidantes, eliminando los radicales libres e inhibiendo la oxidación de los componentes).

Los compuestos fenólicos, así como otros compuestos orgánicos como se discutió previamente, se degradan dependiendo de las condiciones ambientales a las que están sujetos. Escriche, Kadar, Juan-Borrás, & Domenech (2014) evaluaron el impacto del tratamiento térmico industrial en los compuestos fenólicos de las mieles españolas, sometidas a licuefacción (45° C / 48 h) y licuefacción + pasteurización (80° C / 4 min). Los compuestos fenólicos encontrados en estas mieles fueron los ácidos cafeico y ácido cumárico y los flavonoides naringenina, hesperetina, pinocembrina, crisina, galangin, quercetina y kaempferol. Se observó una disminución significativa en la concentración de galangin, kaempferol, myricetin y ácido cumárico después del tratamiento térmico.

➤ **Compuestos volátiles**

El sabor a miel se produce mediante mezclas complejas de compuestos volátiles, que pueden diferir según el néctar, las condiciones de procesamiento, el origen y el almacenamiento. Estos compuestos volátiles proceden de diferentes fuentes, como puede ser la transferencia de compuestos volátiles de la planta, por producción o conversión de otros compuestos en compuestos volátiles por las abejas o como resultado de la presencia de microorganismos desde su recolección.

Más de 400 compuestos diferentes se han identificado en la fracción volátil de la miel, Las mezclas complejas de los compuestos volátiles de diferentes familias químicas que están presentes en la miel se encuentran en concentraciones muy bajas, que generalmente pertenecen a monoterpenos, norisoprenoides C13, sesquiterpenos, derivados del benceno y, a un contenido más bajo de alcoholes superiores, ésteres, ácidos grasos, cetonas, terpenos y aldehídos.

Algunos estudios han evidenciado modificaciones en el perfil de compuestos volátiles presentes en la miel durante su periodo de almacenamiento (Moreira et al., 2010), donde se evaluaron la evolución de varios compuestos volátiles de miel durante 6 meses de almacenamiento. La desaparición del 17-pentatriaconteno en la miel de anacardo se observó en el tercer mes de seguimiento. Por otra parte, otros estudios realizados encontraron que la concentración de otros compuestos volátiles aumentaba con el tiempo de almacenamiento. Esto pone de manifiesto que la evaluación del perfil volátil de la miel, según el tiempo de almacenamiento y/o el proceso industrial involucrado, debe realizarse de manera meticulosa, tratando de obtener la información en cuanto a la formación o pérdida de los compuestos volátiles característicos en la miel evaluada.

1.2.- ADULTERACIÓN DE LA MIEL

1.2.1.- TIPOS DE ADULTERACIÓN DE LA MIEL

Según el Codex Alimentarius, la miel destinada al consumo humano no debe tener ningún ingrediente alimentario que no sea la miel, por lo que debe estar libre de aditivos alimentarios, materias orgánicas e inorgánicas que son ajenas a sus constituyentes originales. La Comisión Europea, en el año 2002 estipuló que a la miel, como producto natural, no se le debe agregar nada. Sin embargo, dado que existe una gran demanda de miel de alta calidad y que los consumidores están dispuestos a pagar precios altos por estos productos, las mieles valiosas se han convertido en el objetivo de la adulteración mediante componentes aditivos dulces y baratos a nivel global. Las mieles adulteradas a menudo se etiquetan como naturales y tienen el mismo precio que la miel pura, lo que es fraudulento e injusto para los consumidores. En general, la adulteración de la miel además de representar un riesgo para la salud de los consumidores, influye negativamente en el crecimiento del mercado al dañar la confianza del consumidor. En consecuencia, la identificación y autenticación de la miel no adulterada es

importante para los procesadores, distribuidores, vendedores y consumidores, así como para las autoridades reguladoras en general.

La adulteración altera la calidad y seguridad de la miel. Por ejemplo, la miel adulterada con productos químicos reduce el valor medicinal y puede dañar a los consumidores. Los adulterantes de miel son principalmente el jarabe de almidón, jarabe invertido, almidón o jarabe invertido que se alimenta a las abejas y miel de baja calidad agregada a la miel de alta calidad. Los métodos de adulteración (Figura 4) de la miel pueden ser directos o indirectos (Naila, Flint, Sulaiman, Ajit, & Weeds, 2018). La adulteración directa es la adición directa de una sustancia a la miel ya elaborada o bien añadir miel de peor calidad a una miel de alta calidad. Los métodos indirectos se producen cuando la abeja se alimenta con miel, productos químicos y azúcares industriales. Por lo tanto, la detección de la adulteración indirecta es mucho más difícil en comparación con la adulteración directa.

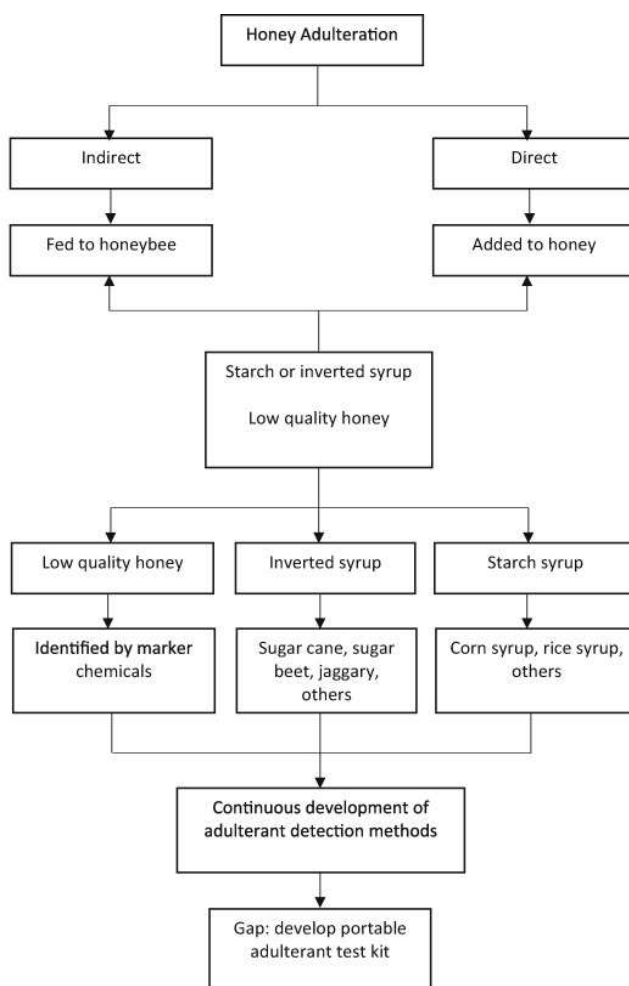


Figura 4. Tipos de adulteración de la miel y líneas de investigación de detección (Naila et al., 2018)

Los principales adulterantes de la miel empleados actualmente son azúcares.

El jarabe de maíz con alto contenido de fructosa (JMAF), el jarabe de glucosa, los jarabes de sacarosa, producidos a partir de remolacha o caña de azúcar, jarabes de inulina con alto contenido de fructosa (HFIS) y los jarabes de azúcar invertido (azúcares procedentes de la disgregación por hidrolización de la sacarosa en glucosa y fructosa) son adulterantes más comunes de la miel.

La fructosa y la glucosa son los dos indicadores clave para el análisis cualitativo de la miel. Los adulterantes, como los jarabes invertidos, se pueden adaptar para imitar el perfil natural de sacarosa-glucosa-fructosa de la miel, lo que dificulta la detección de la adulteración mediante métodos comunes, de aquí que sea un desafío para los científicos descubrir nuevos métodos que sean rápidos, fiables y sobre todo portátiles para distinguir las diferencias de miel pura y adulterada.

En un reciente estudio de detalle sobre los adulterantes empleados en la miel (Wu et al., 2017) se indica como la adición de pequeñas cantidades de jarabe invertido no cambia los niveles de fructosa y glucosa más allá de los rangos normales encontrados en la miel. El JMAF es mucho más barato que la miel no adulterada, mientras que su composición es similar a la de la miel, lo que dificulta su detección. Los jarabes de inulina con alto contenido de fructosa (HFIS) contienen principalmente oligofructosa, que es una mezcla de oligosacáridos de varias longitudes de cadena que tienen unidades de fructosa unidas por enlaces β a una única unidad de glucosa final. Mediante la hidrólisis enzimática parcial de la inulina se puede producir industrialmente jarabes con diferentes grados de polimerización que ahora se utilizan ampliamente como adulterantes en la miel. El jarabe de maíz y el azúcar de caña, provenientes de plantas C4, se detectan fácilmente por métodos tradicionales de análisis, pero el azúcar de remolacha o el jarabe de arroz, provenientes de planta C3 (que siguen un ciclo de fotosíntesis de Calvin similar al de las plantas de las que resulta la miel natural), es un desafío porque no altera prácticamente la proporción de isótopos de carbono de la miel. El Hidroximetil furfural (HMF), un producto de la inversión ácida, se puede utilizar como índice para detectar la presencia de jarabes invertidos en la miel. Sin embargo, existe la posibilidad de que los niveles de HMF aumenten como resultado del calentamiento o incluso del almacenamiento prolongado de la miel. Por tanto, la validez de HMF como indicador de adulterantes en la miel es cuestionable hoy en día.

La adulteración indirecta de la miel es una práctica que se ha desarrollado en los últimos años. Consiste en aplicar una alimentación suplementaria con soluciones concentradas de azúcar a las colmenas de abejas durante el período principal de producción de néctar que puede generar problemas de salud, especialmente en niños y ancianos. Esto se debe a la ambigüedad que rodea a los procesos que realizan las abejas melíferas después de consumir el jarabe de azúcar, así como a la naturaleza de los productos que se producen después de la conversión del azúcar. Abejas alimentadas con azúcares como JMAF, jarabe de sacarosa y jarabes de alimentación para abejas de composición desconocida, se observó que las tasas de mortalidad eran particularmente altas para las abejas melíferas alimentadas con JMAF, presumiblemente debido a los altos niveles de hidroximetilfurfural en el JMAF que se volvió tóxico para las abejas (Se, Wahab, Yaacob, & Krishna, 2019).

La miel de alto valor (por su origen botánico, geográfico o proceso de producción), también se puede adulterar con miel de baja calidad o menor valor económico. En los últimos años, la miel de acacia a menudo se ha adulterado con miel de colza. La miel de acacia de las flores de *Robinia pseudoacacia* es de un amarillo pálido bastante transparente con un sabor suave y no cristaliza. La miel de colza es dulce, de color ámbar claro y se cristaliza fácilmente. Dado que el color de la miel de colza es similar al de la miel de acacia, a menudo es empleada como adulterante de la miel de acacia (Wu et al., 2017).

1.2.2.- MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN DE ADULTERANTES

Los métodos utilizados para la detección de los adulterantes de la miel fueron resumidos por (Naila et al., 2018) siendo: análisis electroquímico, métodos enzimáticos, cromatografía de capa fina (TLC), isotopía de carbono, análisis de inyección de flujo, cromatografía de gases (GC), cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), cromatografía líquida de intercambio aniónico (LC), transformada de Fourier. espectroscopia infrarroja (FTIR), calorimetría diferencial de barrido (DSC), infrarrojo medio, infrarrojo cercano (NIR), espectroscopia de transfectancia, cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS), cromatografía de intercambio aniónico de alto rendimiento (HP) con método de detección amperométrica pulsada (HPAEC-PAD), cromatografía de capa fina de alto rendimiento (HPTLC), espectrometría de masas de relación isotópica acoplada con un analizador elemental, microscopia combinado con PCR en tiempo real, espectroscopía de fluorescencia tridimensional (3DFS) junto con calibración multivariable, analizador electrónico de calidad de

miel, sensor de desplazamiento de fibra óptica (FODS) y resonancia magnética nuclear (RMN). Sin embargo, ninguno de los métodos hasta la fecha podría utilizarse para identificar todos los adulterantes en la miel simultáneamente.

Los principales métodos de detección de adulterantes de miel que hoy en día presentan un mayor potencial de desarrollo para la detección rápida, fiable y portátil son los que se citan a continuación (Naila et al., 2018):

➤ **Espectroscopía**

La espectroscopia infrarroja (IR) puede detectar muchos adulterantes en los alimentos y se considera superior a otros métodos. La preparación de la muestra es nula o mínima y el tamaño de muestra necesario para el análisis es pequeño. Además, el método se considera de bajo costo, rápido, no destructivo y fácil de usar (Wu et al., 2017). Por lo tanto, el equipo tiene el potencial de ser portátil para llevarlo al campo para el análisis *in situ* de los adulterantes de la miel.

➤ **Lengua electrónica**

La biomimética consiste en imitar los sentidos humanos para diseñar instrumentos como la nariz electrónica o la lengua electrónica cuya tecnología emergente la ciencia está desarrollando a gran velocidad. La nanotecnología se utiliza para minimizar el tamaño de estos instrumentos y el rendimiento de estos sensores se mejora con los ordenadores y su software utilizando técnicas de calibración. La lengua electrónica imita los sistemas gustativos del ser humano. La identificación de los sabores se realiza mediante el reconocimiento de patrones y la calibración multivariable mediante software para el procesamiento de datos. La lengua electrónica es una herramienta multisensorial que toma la huella dactilar de los alimentos y luego se utilizan las herramientas quimiométricas para procesar los datos.

La lengua electrónica detecta e identifica el material complejo en el líquido, incluso si los diferentes componentes son muy similares por el reconocimiento de patrones y por la técnica de calibración multivariable e identifican cualitativa y cuantitativamente los materiales objetivo. Aunque muchos análisis de alimentos se han llevado a cabo utilizando lengua electrónica, los pocos estudios que lo han aplicado al análisis de la miel han dado resultados favorables en el área de detección de adulterantes añadidos a la miel (Gan et al., 2016). Por lo tanto, se puede desarrollar una lengua electrónica para todos los adulterantes de la miel y de dimensiones pequeñas de manera que pueda ser portátil.

➤ **Inmunoensayos**

Los inmunoensayos son técnicas analíticas que se basan en la interacción de anticuerpos y antígenos. El anticuerpo, una glicoproteína, se produce en el cuerpo cuando este se expone a un cuerpo extraño, el antígeno. El inmunoensayo se emplea para detectar cuerpos extraños (antígenos) en una matriz de muestra donde el anticuerpo localiza y captura los antígenos. Cuando el anticuerpo reacciona con su antígeno, se forma el complejo antígeno-anticuerpo y este se mide para identificar y cuantificar la cantidad de cuerpo extraño presente en las muestras.

Pocas pruebas se han utilizado para identificar la miel adulterada y pura utilizando técnicas de inmunoensayos. Las pruebas biológicas desarrolladas actualmente para la identificación de miel pura y adulterada que incluyen métodos inmunológicos consideran principalmente como marcadores las proteínas de la miel, las enzimas de la miel y ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas marcadoras (método ELISA). Los principales problemas para el desarrollo de inmunoensayos para la detección de adulterantes en la miel están en que la proteína en la miel se encuentra en muy baja concentración (lo que complica su uso como marcadores) y en que las enzimas de la miel para poder actuar como biosensores deben estar en estado activo y las enzimas se vuelven inactivas durante el periodo de almacenamiento de la miel o cuando esta se somete a un calentamiento.

➤ **Microscopía**

El análisis microscópico de la miel puede ser una técnica para la detección de adulterantes específicos de la miel aunque a día de hoy prácticamente no se ha desarrollado.

Los métodos microscópicos se basan principalmente en la detección del polen presente en la miel, lo cual proporciona información sobre el origen geográfico y botánico de la misma, pero no proporciona información sobre los adulterantes de la miel. Este método, junto con el análisis fisicoquímico de la miel, se puede utilizar para identificar la calidad de la miel con fines comerciales. La detección de polen que se realiza a través de un microscopio es un trabajo tedioso y necesita ser reemplazado por un método más eficiente que pudiera hacerse portátil. Existe la posibilidad de utilizar la detección de polen como un indicador de la adulteración de la miel, ya que la miel de una región geográfica en particular, presenta un perfil de polen característico y por lo tanto se puede esperar que los perfiles de polen característicos se alteren con la adulteración de la miel.

Se han realizado estudios basados en la identificación microscópica de adulterantes específicos en la miel (detección de azúcar de caña o jarabe de azúcar hidrolizado en adulteración indirecta como alimento para las abejas), pero en lugar de utilizar solo análisis microscópicos para adulterantes, es más preciso combinarlo con otros métodos como el análisis fisicoquímico, HPLC y PCR. Los métodos microscópicos pueden ser más útiles en los países en desarrollo donde los métodos alternativos no son prácticos debido al alto costo.

➤ **Tixotropicidad**

La tixotropicidad o propiedades reológicas de la miel podrían explorarse para desarrollar un método rápido y fiable para la detección de adulterantes de la miel. Por ejemplo, los adulterantes como los jarabes de fructosa y sacarosa añadidos en la miel natural pueden detectarse mediante métodos reológicos (Tahsin et al., 2014). En este estudio, la miel natural se adulteró con diferentes niveles de sacarosa y jarabes de fructosa en una proporción de 0 a 50% en peso. Se realizaron ensayos reológicos de fluencia, pruebas de dinámica y de cizallamiento constante para detectar tales adulteraciones en proporciones específicas. Los resultados de las pruebas de análisis reológico revelaron que la adulteración en estos niveles podría detectarse claramente mediante cambios notables en el flujo, el comportamiento viscoelástico y de fluencia de la miel natural. Cuando se añadió sacarosa y jarabe de fructosa a la miel natural, la viscosidad disminuyó y la disminución se incrementó a medida que aumentaba la concentración de los adulterantes. El esfuerzo cortante de la miel adulterada disminuye a medida que aumenta el contenido de adulterante, lo que resulta en la disminución de la viscosidad de la miel. Estos resultados resaltan que los adulterantes de los jarabes de miel, sacarosa y fructosa se pueden detectar con éxito mediante análisis reológicos. La miel es un líquido viscoso que no es elástico por naturaleza y posee un comportamiento similar al líquido. La resistencia a la deformación de la miel adulterada es baja en comparación con la miel natural. Con la inclusión de los adulterantes en la miel, la naturaleza viscoelástica de la miel cambia a medida que aumenta la deformación.

Las correlaciones significativas encontradas entre los parámetros de reología y la composición de azúcar de las muestras de miel adulterada sugirieron que estos parámetros podrían ser una combinación de indicadores para la detección de tales adulteraciones en la miel en proporciones específicas y por lo tanto podrían emplearse para determinar con precisión el estado de adulteración de las muestras de miel por adicción de sacarosa y/o fructosa.

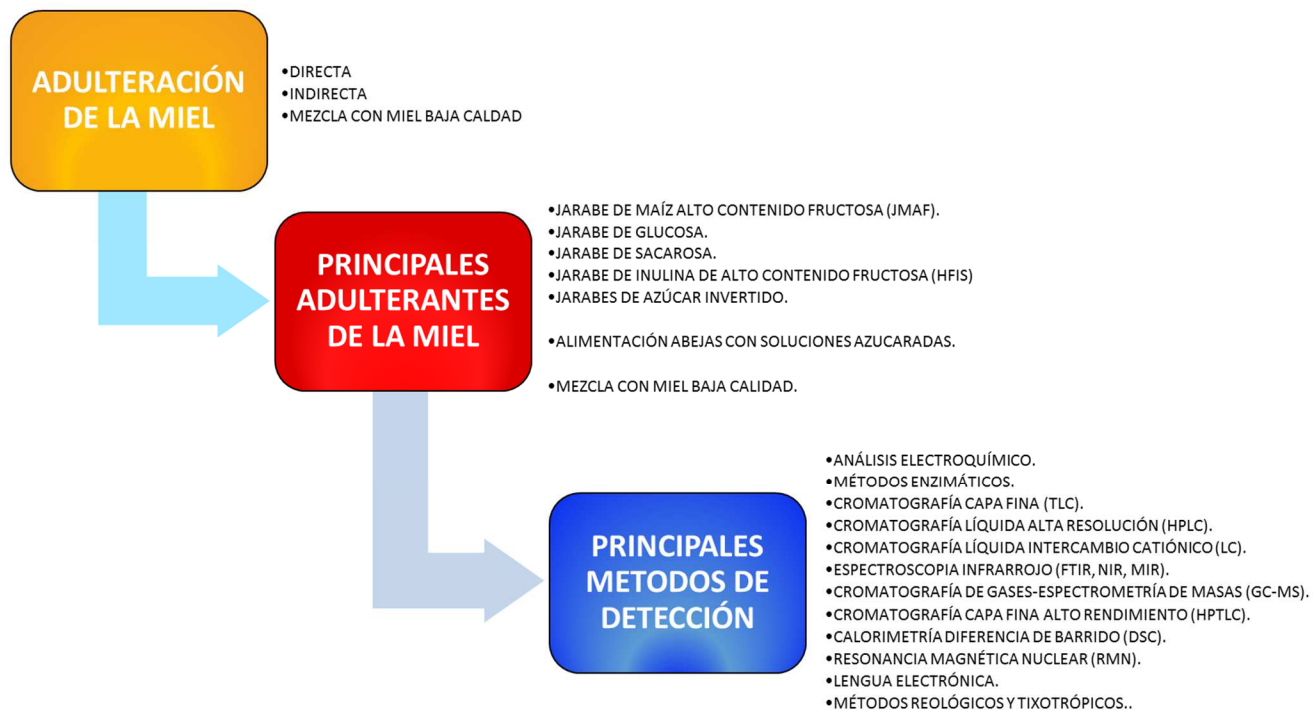


Figura 5. Diagrama resumen de los principales adulterantes de la miel y de los métodos de detección actuales.

1.3.- PLANTEAMIENTO DE LA CUESTIÓN. OBJETIVO

De la lectura de la bibliografía existente se reporta que existen diferentes técnicas válidas para la detección de adulterantes en la miel (cromatografía gases, cromatografía líquida, cromatografía capa fina, espectrofotogrametría, resonancia magnética nuclear, SCIRA, métodos reológicos, análisis químicos, etc). La tecnología NIRS junto con las técnicas de quimiometría apropiadas, además de ser una técnica válida para la identificación de distintos tipos de adulterantes de la miel tiene varias ventajas respecto de otras técnicas: es una técnica no destructiva, rápida, de fácil preparación de muestras, no requiere de personal altamente cualificado y con equipos de análisis móviles o portátiles ya desarrollados. Sin embargo, la variabilidad de los distintos tipos de mieles que hay en el mercado (por su origen botánico, origen geográfico, especie de abeja productora, condiciones climatológicas, modo de producción o manejo de abejas, etc) y de los adulterantes que se emplean hoy en día (jarabes de maíz, remolacha, arroz, inulina, adulteración indirecta, etc) hace que quede un

amplio campo de investigación en este sentido. Por todo esto, el objetivo de este trabajo será determinar si la tecnología NIRS junto con la quimiometría presenta un buen grado de fiabilidad o precisión a la hora de detectar adulterantes en la miel tipo multifloral (la más habitualmente producida y consumida a nivel global).

1.4.- ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO

1.4.1.- BASES TEÓRICAS

El infrarrojo (IR) corresponde a la región del espectro electromagnético que comprende longitudes de onda de 780 a 10^6 nm. A su vez esta región se divide en 3 zonas, representadas en la Figura 6: Infrarrojo cercano de 780 a 2500 nm (NIR), Infrarrojo medio de 2500 a $5 \cdot 10^4$ nm (MIR) e Infrarrojo lejano de $5 \cdot 10^4$ a 10^6 nm (FIR) (López Maestresalas, 2016).

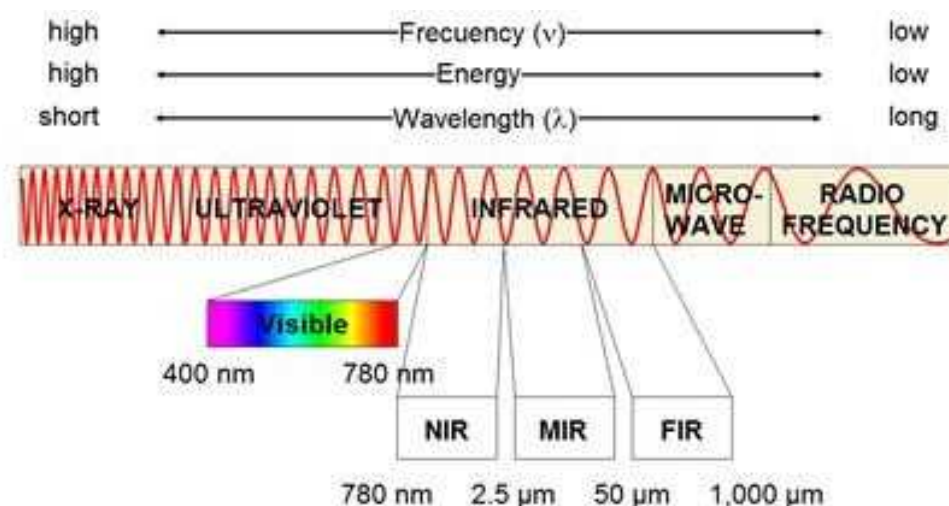


Figura 6. Espectro electromagnético (López-Maestresalas, 2016).

La espectroscopia NIR estudia la interacción de la radiación electromagnética del infrarrojo cercano con la materia. La radiación penetra en la muestra e interactúa con los enlaces de las moléculas, especialmente con los de la forma -CH, -NH, -OH y -CO, que absorben fotones de esa región de acuerdo con sus frecuencias de vibración específicas. Los principales modos vibracionales de las moléculas son el estiramiento (*stretching*) y la flexión (*bending*). Las vibraciones de estiramiento producen un cambio continuo de la distancia entre los átomos sin abandonar el eje del enlace, pudiendo ser simétrico o asimétrico, mientras que las de flexión

se caracterizan por un cambio en el ángulo de dos enlaces. Una molécula absorbe IR solamente cuando la frecuencia de la radiación coincide con la de los armónicos y las combinaciones de modos vibratorios fundamentales que causan un cambio en el momento dipolar de la molécula (Pasquini, 2018) (Miller, 2001). Cuando esto ocurre, la molécula pasa del estado de vibración fundamental a un estado excitado, aumentando la amplitud del movimiento vibratorio de los átomos del enlace. En especies moleculares homonucleares como H₂, O₂ y N₂, no hay diferencias entre los estados vibracionales, por lo que no absorben radiación en el infrarrojo. Por el contrario, los enlaces que vibran con gran energía y amplitud son los enlaces que contienen átomos de hidrógeno, dando lugar a bandas de gran intensidad (Ozaki *et al.*, 2018).

En el espectro obtenido se representa gráficamente la intensidad de la radiación transmitida o reflejada por la muestra en las diferentes longitudes de onda. De este modo se generan una serie de bandas de absorción a determinadas frecuencias que se corresponden con aquellas frecuencias de transición vibracional que dan las vibraciones características de la molécula. La intensidad de dichas bandas sigue la Ley de Lambert-Beer, que propone que la absorbancia a cualquier longitud de onda es proporcional a la concentración de moléculas absorbentes presentes en el camino de la radiación. De este modo, se pueden realizar determinaciones cuantitativas de una muestra a partir de la identificación cualitativa de las bandas. Sin embargo, los datos NIR tienen una baja selectividad debido a la superposición de bandas de absorción y a la gran cantidad de datos e información redundante (colinealidad) que se obtienen. Por ello, es necesario el uso de métodos multivariantes para extraer información de los espectros NIR (López-Maestresalas, 2016).

1.4.2.- INSTRUMENTACIÓN

Existen cuatro modos para llevar a cabo las mediciones con espectroscopia NIR: reflectancia, transmitancia, transflectancia e interactancia (Figura 7). La elección del modo de obtención de los datos dependerá del tipo de muestra y componentes que se deseen analizar.

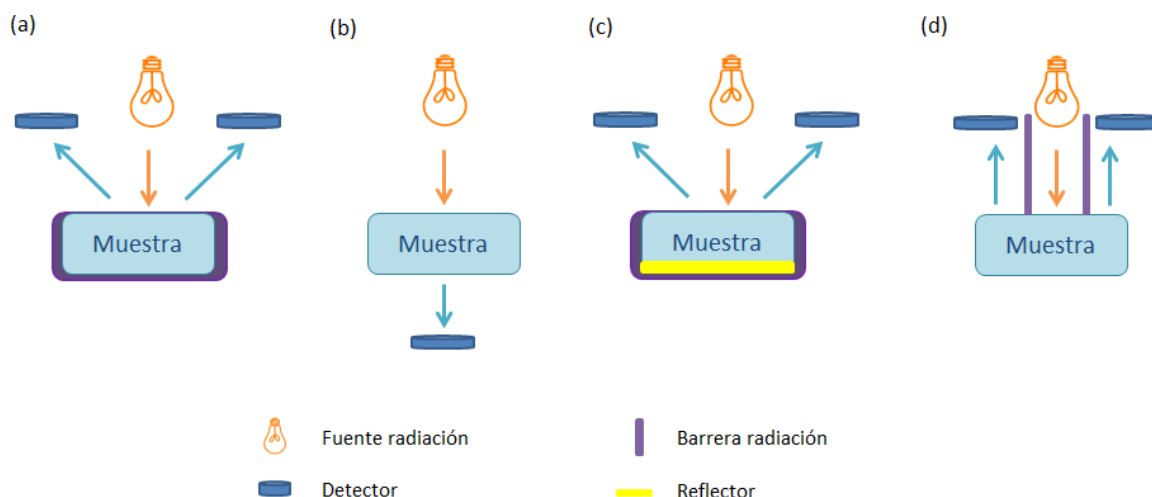


Figura 7. Modos de medición NIRS: (a) reflectancia, (b) transmitancia, (c) transflectancia e (d) interactancia.

- **Modo de reflectancia.** La radiación es reflejada por la superficie de la muestra. El detector se sitúa en el mismo lado que la fuente de luz para capturar la luz reflejada. Mide tanto la reflectancia especular, que no aporta información de la composición interna, como la reflectancia difusa, en la que la luz reflejada ha interactuado con las partículas internas de la muestra aportando información. Generalmente se usa para muestras sólidas o granulares.
- **Modo de transmitancia.** Miden la cantidad de luz transmitida a través de la muestra. El detector está ubicado en el lado opuesto de la iluminación y normalmente se utiliza para el análisis de muestras de líquidos y ciertas muestras sólidas como granos, carne, productos lácteos, etc.
- **Modo de transflectancia.** Es una combinación de reflectancia y transmitancia, en el que la fuente de luz y el detector se colocan paralelos entre sí en el mismo lado del producto.
- **Modo de interactancia.** El detector se separa de la fuente de luz, pero ambos están en contacto directo con la superficie de la muestra, de este modo se evita la medición de la reflectancia especular. Este tipo de medición es más adecuado para muestras grandes, como frutas enteras.

Un equipo NIRS está formado principalmente por 5 componentes: una fuente de radiación, una red de difracción, un portamuestras, un detector fotoeléctrico para medir la intensidad de la luz detectada y convertirla en señales eléctricas, y finalmente un sistema para procesar los datos espectrales (López-Maestresalas, 2016; Bergera, Jarén, & Arana, 2006).

- **Fuente de radiación.** Existen fuentes continuas y lineales. Las fuentes continuas más utilizadas son las lámparas halógenas de tungsteno, que emiten radiación de alta intensidad de forma continua. Las fuentes lineales se utilizan generalmente cuando no se requiere de un espectro completo, se incluyen los láseres, diodos láser y diodos emisores de luz (LEDs).
- **Red de difracción.** Son unos dispositivos de selección de longitudes de onda que pueden ser móviles en el caso del sistema de filtros y monocromador, o estacionarios para los filtros optoacústicos ajustables (AOFT) y matriz de diodos.
- **Portamuestras.** Es el lugar en el que se coloca la muestra, donde se produce una interacción entre el NIR y el objeto de estudio. Existen gran variedad para los diferentes tipos de análisis (reflectancia, transmitancia, transflectancia e interactancia).
- **Detector.** Es el sensor que mide la intensidad de la radiación NIR y la transforma en señales eléctricas. Según su funcionamiento se distinguen los detectores térmicos y detectores sensibles a los fotones o fotodiodos. Los detectores térmicos incluyen aquellos dispositivos basados en sulfato de triglicina deuterada (DTGS) junto con termopares, bolómetros y termistores, entre otros. Los detectores sensibles a fotones más usados son los fotodiodos de silicio, arseniuro de galio e indio (InGaAs) y seleniuro de plomo (PbSe).
- **Sistema de adquisición y procesamiento de datos.** Normalmente un microprocesador u ordenador capaz de procesar y analizar datos espectrales utilizando un software específico.

Además, a la hora de seleccionar un dispositivo de medición adecuado es importante tener en cuenta el tipo de muestra y el grado de penetración que existe en las diferentes longitudes de onda. Lammertyn, Peirs, Baerdemaeker, & Nicolai, (2000), observaron que dentro de la región NIR, entre los 700 y 900 nm la radiación podía penetrar unos 4 mm en el interior de

manzanas, mientras que a 900 – 1900 nm solamente 2-3 mm. Esto puede deberse a que las ondas que presentan menor longitud de onda son más energéticas y son capaces de penetrar con mayor facilidad en el alimento.

Según López-Maestresalas (2016) la espectroscopia NIR es una herramienta analítica que presenta una serie de ventajas:

- Técnica no destructiva y no invasiva.
- No requiere apenas preparación de la muestra.
- Análisis rápido.
- Respetuosa con el medio ambiente ya que no genera residuos.
- Versátil: puede ser utilizada para diferentes productos.
- Permite un análisis rentable.
- Un único espectro NIR contiene información tanto física como química de una muestra.

Sin embargo, este método presenta algunos inconvenientes que pueden afectar a su implementación en la industria agroalimentaria, como son:

- Dependencia de métodos de referencia basados en análisis físico-químicos.
- Precio relativamente alto del equipo.
- Dificultad de transferir modelos de un instrumento a otro.
- Limitación de uso, ya que los resultados obtenidos sólo son aplicables a muestras con características similares a las que se usaron para desarrollar el modelo.
- Necesidad de personal cualificado para llevar a cabo los análisis multivariantes.

1.4.3.- QUIMIOMETRÍA

Para realizar una evaluación de la calidad, la tecnología NIRS se basa en establecer una relación entre los datos espectrales del producto y sus características físico-químicas, mediante la creación de modelos de calibración. Sin embargo, los espectros NIR contienen grandes cantidades de datos, con mucho ruido e información redundante. Además, según (Nicola et al., 2007) los espectros de frutas y verduras son especialmente difíciles de interpretar por varios motivos. El agua es el componente químico mayoritario en este tipo de alimentos y sus bandas de absorción enmascaran y dominan el espectro. Además, la rica composición química del producto da como resultado un conjunto de sobretonos y bandas de combinación que aportan mayor complejidad al espectro. Y, por último, el espectro puede complicarse aún más por los efectos de dispersión dependientes de la longitud de onda, la heterogeneidad de los tejidos, el ruido instrumental y los efectos ambientales, entre otros. Por tanto, para poder asignar correctamente las bandas de absorción a grupos funcionales específicos se requiere de técnicas estadísticas multivariantes, también llamadas quimiométricas, donde los datos sufren un tratamiento previo para eliminar la información irrelevante que no puede ser manejada adecuadamente por técnicas de regresión. De este modo, la quimiometría analiza los datos teniendo en cuenta varias variables de forma simultánea y extrae la información útil de los espectros, mejorando significativamente las aplicaciones del NIRS. La quimiometría abarca una amplia gama de métodos que incluyen el pretratamiento de datos espectrales, la construcción de modelos de calibración para el análisis cualitativo y cuantitativo, y la transferencia de modelos (Qu, Liu, Cheng, Pu, & Zeng, 2015).

1.4.3.1.- Análisis cuantitativo

El análisis cuantitativo consiste en estimar la concentración de un compuesto en la muestra a partir de un modelo matemático. Este modelo relaciona los valores de reflectancia NIR y la concentración de dicho compuesto, que ha sido determinada mediante un método de referencia. A continuación se describen los pasos que se deben seguir para desarrollar un modelo robusto y fiable:

Modelo de calibración

Primero se establece una ecuación de calibración para poder predecir el parámetro físico-químico que se desea establecer en otras muestras de características similares a las

utilizadas para realizar la calibración. Para su elaboración se distinguen los siguientes pasos (Peguero Gutierrez, 2010):

- **Selección de muestras.** Deberán ser representativas del producto, cubriendo la variabilidad existente para dicho producto. Además, cuanto mayor sea el número de muestras, mayor capacidad de predicción presentará la ecuación.
- **Métodos de referencia.** Se realizan análisis físico-químicos sobre las muestras para conocer con exactitud el parámetro que se desea estudiar.
- **Registro de la información espectral.** En el presente estudio, la información química de las muestras se extraerá de los espectros NIR. Todas las muestras (calibración y predicción) deberán registrarse en el mismo equipo siguiendo el mismo protocolo de análisis. Los espectros NIR se caracterizan por tener bandas anchas y solapadas por lo que es necesario un posterior tratamiento matemático de los datos para obtener la información de interés.
- **Selección de las variables espectrales.** Identificar las bandas de absorción del espectro NIR que sean de interés según los parámetros que se desean analizar.
- **Pretratamiento de los datos espectrales.** La complejidad de los espectros hace necesario la aplicación de pretratamientos, mediante las siguientes técnicas (Nicolai *et al.*, 2007):
 - Promedio de espectros. Se lleva a cabo generalmente durante la adquisición del espectro para reducir el ruido térmico de los detectores.
 - Centrado de los datos (*Mean Center*). Es un pretratamiento recomendado para todas las aplicaciones técnicas. Se basa en restar a cada variable su promedio para centrar los datos.
 - Suavizado (*Smoothing*). Existen filtros para eliminar el ruido aleatorio de los espectros NIR, incluyendo el algoritmo Savitzky-Golay o la Transformada de Fourier (Peguero *et al.*, 2010).
 - Derivación. Permite eliminar los cambios en la línea de base y los picos superpuestos. Los más populares son las de segundo orden, ya que pueden corregir tanto los efectos aditivos (desplazamiento de la línea base) como los

multiplicativos (inclinación). Los métodos más usados son el de Norris y el de Savitzky-Golay.

- Normalización. La técnica más habitual es el MSC (Corrección de la dispersión multiplicativa) que se realiza para compensar los efectos aditivos y multiplicativos de los datos espectrales. Este método intenta eliminar los efectos de la dispersión al linealizar cada espectro con el espectro promedio del grupo de calibración.
 - Estandarización. La más utilizada es el SNV (Variable normalizada estándar) que corrige el efecto de la dispersión (*scattering*) mediante el centrado (resta la media) y escalado (divide el espectro de cada longitud de onda entre la desviación estándar de todo el espectro).
 - Deducción de tendencia (*Detrending*). Suele llevarse a cabo junto con el SNV para corregir las variaciones de la línea base, aplicando un polinomio de grado bajo en todos los puntos del espectro y posteriormente restándole la curva resultante al espectro.
- **Desarrollo del modelo.** A continuación se elabora la ecuación de calibración, que relaciona los datos espectrales a los que se les ha aplicado un pretratamiento previo, con los resultados obtenidos mediante los métodos de referencia. Para ello, se emplean técnicas de regresión lineal, siendo las más habituales en el análisis cuantitativo la regresión lineal múltiple (MLR), la regresión de componentes principales (PCR) y la regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS) (Qu *et al.*, 2015).
- **Eliminación de valores atípicos (*Outliers*).** Durante el proceso de elaboración del modelo de calibración pueden detectarse una serie de valores atípicos (*Outliers*). Estos son valores o datos extremos que no encajan con el resto de muestras que conforman el grupo de calibración. Pueden influir negativamente en la capacidad predictiva del modelo, por lo que su detección, interpretación y posible eliminación adquiere especial relevancia dentro del análisis multivariante de los datos espectrales.

Validación del modelo

La validación del modelo se realiza con el fin de evaluar la exactitud del modelo de calibración. Para ello, se pueden emplear los siguientes procedimientos:

- **Validación cruzada.** Sucesivamente se van eliminando datos del grupo de calibración y se utilizan para validar la ecuación que se ha generado con el resto de los datos que no han sido eliminados. Con cada validación se obtiene un residuo de predicción. El proceso se repite hasta que todas las muestras hayan sido utilizadas una vez en el proceso de validación y al final se estima la variación de todos los residuos de predicción. Una variante de esta técnica es la validación cruzada múltiple, en la que extrae un conjunto definido de datos, en vez de extraer datos individuales para realizar la validación (Nicolai *et al.*, 2007).
- **Validación externa.** En este caso, el conjunto de muestras empleadas para realizar la validación es independiente de las de la calibración. La composición de estas muestras es conocida y además, estas muestras son representativas tanto del conjunto de calibración como de las que se vayan a analizar en un futuro.

1.4.3.2.- Análisis cualitativo

El análisis cualitativo permite identificar y clasificar muestras mediante la comparación de los espectros NIR con los de un grupo de muestras con propiedades conocidas. Como en el caso anterior, primero se elabora un modelo de calibración que posteriormente debe ser validado mediante validación cruzada y validación externa. En el análisis cualitativo existen dos métodos para desarrollar el modelo de calibración:

- **Método no supervisado.** La información previa es escasa, por lo que es útil en las primeras etapas de la investigación. El objetivo es identificar la tendencia de agrupamiento de las muestras únicamente con los datos espectrales. Los más utilizados son el análisis de componentes principales (PCA), Cluster jerárquicos y Cluster de partición (no jerárquicos).
- **Método supervisado.** Existe información previa sobre los grupos existentes en el conjunto de muestras. Este método genera reglas de clasificación para agrupar las muestras con las que presenten mayor semejanza en términos estadísticos. Los más empleados son: análisis discriminante mediante el método de PLS (PLS-DA), análisis discriminante lineal (LDA) y cuadrático (QDA), entre otros.

1.5.- APLICACIONES DE LA TECNOLOGÍA NIRS EN DETECCIÓN DE ADULTERACIÓN EN LA MIEL

Como se ha comentado anteriormente, son muchas las técnicas empleadas en la actualidad en la detección de la miel adulterada entre las que cabe destacar la espectroscopia de masas espectrometría de masas con relación isotópica de carbono estable (SCIRA), la cromatografía de capa fina (TLC), Cromatografía de gases (GC), cromatografía de intercambio aniónico (HPAEC), cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), el análisis térmico y resonancia magnética nuclear (RMN), etc. (Guelpa, Marini, Slabbert, & Manley, 2017). y (Wu et al., 2017).

Aunque se ha evidenciado que estas técnicas son útiles para evaluar la adulteración en la miel, son métodos caros, requieren mucho tiempo, son destructivos (a excepción de la RMN, que también es una técnica no destructiva) y requiere que el operador tenga una habilidad considerable. Por lo tanto, existe la necesidad de poder contar con una técnica de clasificación rápida, no destructiva, de fácil uso y de bajo coste que permita la detección de la adulteración de la miel pura. Además, el disponer de una técnica fiable y no destructiva, en caso de detectarse fraude por adulteración, al conservar la muestra integra, permite que se vuelva a analizar después de un tiempo o si es necesario, con una técnica alternativa. (Latorre, Crecente, Martín, & García, 2013).

La espectroscopia de infrarrojo cercano (NIR) en combinación con la quimiometría se ha utilizado previamente en una gran cantidad de estudios sobre la miel, principalmente para determinar el origen floral de la miel o para autentificar su origen geográfico. ((Chen et al., 2012), (Latorre et al., 2013)). Sin embargo, los estudios sobre el empleo de la espectroscopia NIR y la quimiometría en la detección del fraude en la miel debido a la adicción de adulterantes no son muy numerosos, aunque en estos últimos años, debido al auge del consumo de miel y por ende de la adulteración de la misma, se están incorporado más referencias en cuanto al uso de la tecnología NIRS para la detección de edulcorantes añadidos en miel pura (Wu et al., 2017), (Ferreiro-gonzález et al., 2018), (Se et al., 2019).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1.- MUESTRAS

2.1.1.- MIELES

Para el estudio se ha empleado miel pura multifloral de origen Navarra, marca LOREZ-LORE adquirida directamente al productor (Figura 8). Procedente de la zona Oriental de Navarra, fue cosechada y envasada en junio del 2019, empleando únicamente procedimientos de extracción mecánicos (centrifugado). Posee el sello de “ALIMENTOS ARTESANOS DE NAVARRA” lo que garantiza tanto la calidad como el cumplimiento de la normativa en cuanto a los estándares de producción artesanales, no empleando ni pasteurización ni prensado durante el proceso de elaboración.



Figura 8: Muestras de miel pura empleada en el estudio.

2.1.2.- ADULTERANTES

Como adulterantes añadidos a la miel pura se han empleado dos tipos diferentes:

1. **Adulterante azucarado de fructosa + glucosa:** En proporción de 1:0,85 en peso, por ser la proporción más habitual encontrada en la composición química de las mieles naturales tratando así de asemejar químicamente el adulterante a la composición de la miel. La fructosa y la glucosa fueron adquiridos a la empresa Panreac Quimica

S.L.U. de Castellar del Vallés (Barcelona), con una riqueza del 99 % tanto en la fructosa como en la glucosa (Figura 9 a).

2. **Miel de baja calidad (MBC):** Miel natural de milflores de marca blanca EROSKI, adquirida en una gran superficie comercial local. No etiquetada como 100 % procedente de la UE (Figura 9 b).



Figura 9. (a) Fructosa y glucosa empleados como adulterante tipo 1. (b) Miel de baja calidad empleado como adulterante tipo 2.

2.2.- INSTRUMENTACIÓN

2.2.1.- EQUIPO ESPECTROSCOPIA INFRARROJO CERCANO (NIRS)

Los espectros de reflectancia de todas las muestras de mieles se obtuvieron mediante un espectrofotómetro Brimrose Luminar 5030 (Figura 10), que utiliza la tecnología AOTF (Filtro optoacústico ajustable). El funcionamiento del equipo se basa en la emisión de un haz de luz que irradia la muestra. El haz incide sobre la muestra, parte de la luz es reflejada y recogida por un detector InGaAs. Este detector envía señales que son leídas y tratadas por el programa informático SNAP32 (Brimrose Corporation of America). En este estudio, posteriormente se migraron los datos espectrales a un archivo Excel para ser procesados en el entorno de MATLAB.



Figura 10. Espectrofotómetro Brimrose Luminar 5030

Antes de realizar las mediciones, cada día de ensayo, el equipo se calibró utilizando una muestra de miel pura, asumiendo que la medición era correcta y que el equipo estaba correctamente calibrado cuando la ganancia del amplificador interno del equipo tuviese valores entre 33.000 y 66.000.

Las mediciones las realiza el equipo a intervalos de 2 nm, en el rango espectral entre 1200 - 2200 nm, con una velocidad de escaneado de 16000 longitudes de onda por segundo. En cada medición, el espectrofotómetro toma 50 espectros para proporcionar un espectro medio compuesto por los valores de reflectancia para cada longitud de onda del rango espectral medido. De este modo, se toman 501 datos de reflectancia por espectro.

La toma de los espectros de cada muestra se llevó a cabo en varios puntos aleatorios sobre la misma, la cual se colocó en una placa Petri de vidrio especialmente indicada para muestras líquidas.

2.3.- PROCEDIMIENTO DE ADULTERACIÓN

Para estudiar la efectividad de la tecnología NIRS en la detección de los adulterantes indicados anteriormente en la miel, fue necesario llevar a cabo la adulteración de la miel pura

a distintos niveles. Para cada adulterante empleado (fructosa:glucosa y miel de baja calidad), se realizaron cuatro niveles de adulteración; 0% (control), 1%, 5% y 10% en peso de adulterante.

Las muestras se almacenaron sin refrigerar desde el momento de la adquisición. Antes de la medición espectral, las mieles se incubaron a 55° C durante las 24 h anteriores para disolver cualquier material cristalino y se agitó manualmente para garantizar la homogeneidad y evitar complicaciones espectrales por variaciones naturales en la concentración de azúcar (Zhu et al., 2010).

La mezcla del adulterante de fructosa:glucosa se preparó disolviendo la fructosa y glucosa en agua destilada en la proporción: 1:0,85 en peso.

Se procedió a realizar la adulteración de la miel pura con cada uno de los adulterantes (fructosa:glucosa y miel de baja calidad) para los tres niveles de adulteración (1%, 5% y 10%,) obteniendo 20 muestras para cada adulterante y nivel de adulteración. Además, se prepararon 20 muestras de miel pura sin adulterar para cada adulterante denominadas y empleadas como muestra control (Figura 11).

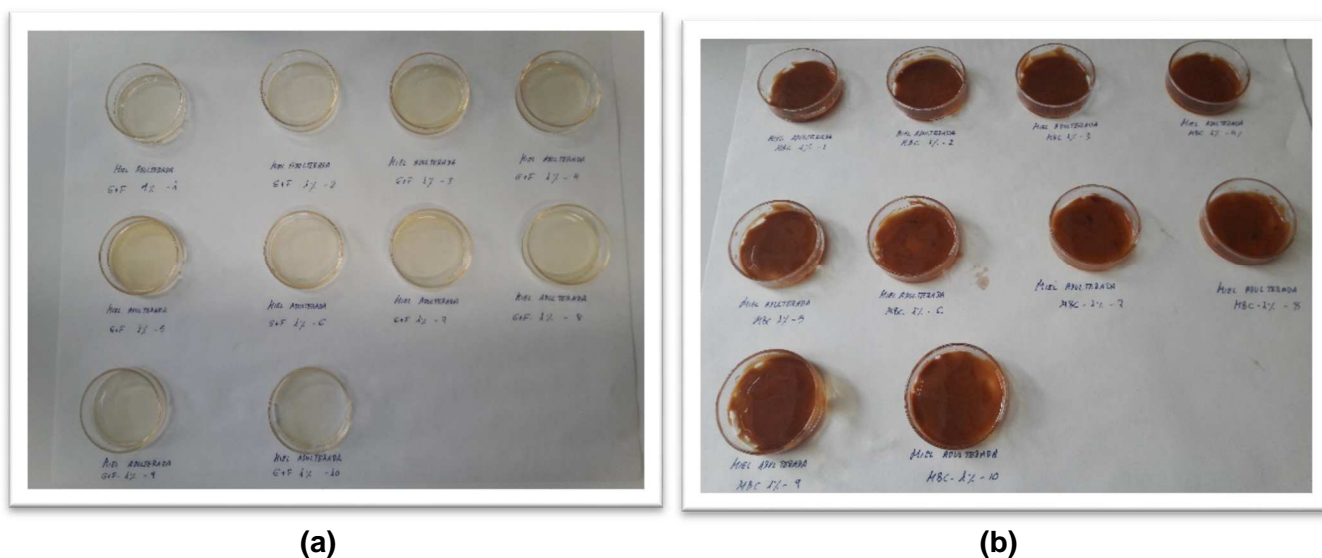


Figura 11. (a) 10 Muestras de miel adulterada con fructosa:glucosa al 1%. **(b)** 10 Muestras de miel adulterada con miel de baja calidad al 1%.

2.4.- ANÁLISIS QUIMIOMÉTRICO: DESARROLLO DEL MODELO DE CLASIFICACIÓN

Tras la toma de datos del análisis espectral de las muestras de miel, para poder valorar la potencialidad de la tecnología NIRS en la detección de agentes adulterantes en la miel, se hace preciso el empleo de técnicas quimiométricas de clasificación supervisada (análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales o PLS-DA) para desarrollar el modelo de clasificación de las mieles adulteradas.

Previamente al desarrollo del modelo de clasificación, se llevó a cabo un procesado previo de los datos espectrales para eliminar los efectos no informativos de la dispersión de la luz o el ruido del sistema para evitar que la consistencia del modelo desarrollado pudiera verse afectada negativamente. Las técnicas de pretratamiento de datos que se emplearon para corregir los efectos no informativos producidos por la dispersión de la luz, la superposición de picos espectrales y dispersión de la línea base fueron la corrección de dispersión multiplicativa (MSC), la variación normal estándar (SNV), el centrado medio (MC) y los métodos de derivados espectrales: la primera derivada (1st Der) y la segunda derivada (2nd Der) mediante polinomios de segundo orden y 15 puntos de ventana.

Se analizó y evaluó el rendimiento de los modelos de clasificación utilizando diferentes combinaciones de las técnicas de pretratamiento anteriormente indicadas.

2.4.1.- ANÁLISIS DE DATOS SUPERVISADO: PLS-DA

El PLS-DA es un método de regresión lineal que se combina con el análisis discriminante. PLS-DA define nuevas variables, las llamadas Variables Latentes (LV), que son combinaciones lineales de las originales que maximizan la covarianza entre las matrices X e Y donde se establece relación entre las variables predictivas (X) y la variable dependiente (Y). Las columnas de la matriz X están definidas por los datos de reflectancia obtenidos en cada longitud de onda y las filas por el número de muestras analizadas (n). En este caso la matriz Y es una matriz simulada en código binario con el mismo número de filas que la matriz X y el mismo número de columnas que los grupos de clasificación definidos. De esta forma, cada fila de Y será un vector formado por ceros, excepto para los componentes que pertenecen a las muestras de esa categoría, que serán iguales a 1. Una vez que se define la matriz Y, se

realiza una regresión PLS de las variables ficticias sobre las variables X. Las muestras desconocidas se clasifican en una clase determinada según su valor predicho. El número de variables latentes (LV) se determinó mediante validación cruzada.

Con el análisis discriminante por mínimos cuadrados (PLS-DA) se realizó una clasificación de las muestras de miel en diferentes grupos a través de sus espectros NIR, teniendo en cuenta que cada grupo corresponde a un agente adulterante (fructosa:glucosa o miel de baja calidad) y nivel de adulteración conocido (0%, 1%, 5% y 10%).

Se definieron 4 grupos de clasificación para cada agente adulterante en función del nivel de adulteración. Por tanto, la matriz respuesta Y estaba compuesta por 4 columnas:

- ✧ **Grupo 1.** (Nivel adulteración 1%) con el vector [1 0 0 0]
- ✧ **Grupo 2.** (Nivel adulteración 5%) con el vector [0 1 0 0]
- ✧ **Grupo 3.** (Nivel adulteración 10%) con el vector [0 0 1 0]
- ✧ **Grupo 4.** (Nivel adulteración 0% - muestra control) con el vector [0 0 0 1]

2.4.2.- VALIDACIÓN Y PRECISIÓN DEL MODELO

El conjunto de datos para cada muestra de agente adulterante y nivel de adulteración se dividió aleatoriamente en conjuntos de calibración y validación. Para ello, se formó el conjunto de validación con el 30 % de los valores iniciales en una permutación aleatoria desarrollada para cada grupo de conjunto de datos y el 70 % restante de valores se empleó para construir el modelo de clasificación.

Para evaluar la precisión de los modelos PLS-DA obtenidos tras realizar la validación cruzada, se tuvo en cuenta el porcentaje de muestras clasificadas correctamente (%CC) y los valores de sensibilidad y especificidad obtenidos en los conjuntos de validación (López-maestresalas et al., 2019). Dichos parámetros se definen de la siguiente manera:

- $Sensibilidad = \frac{TP}{TP+FN}$
- $Especificidad = \frac{TN}{TN+FP}$

donde, verdaderos positivos (TP) es la proporción de muestras de clase A que son correctamente clasificadas en su clase A; Falsos positivos (FP) es la proporción de muestras de clase A que se clasifican como B; Verdaderos negativos (TN) es la proporción de muestras de clase B que son clasificadas en su clase B y falsos negativos (FN) es la proporción de muestras de clase B que se clasifican como A.

Ambos parámetros, sensibilidad y especificidad, presentan valores entre 0 y 1, siendo este último el mejor resultado, ya que indica una clara diferenciación entre las muestras estudiadas.

En el presente estudio, tanto el pretratamiento de los datos espectrales obtenidos con el espectrofotómetro, como los análisis de regresión PLS-DA se llevaron a cabo con el programa informático *PLS_Toolbox_881* (Eigenvector Reserach Inc. Wenatchee, WA) bajo el entorno MATLAB R2019a (The MathWorks, Natick, MA).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1.- INTERPRETACIÓN DE ESPECTROS NIR

En el presente estudio, primeramente se llevó a cabo el análisis de los espectros tomados a todas las muestras de miel adulteradas con mezcla de fructosa:glucosa (1:0,85) y con miel de baja calidad en los niveles de adulteración de 1%, 5% y 10% respectivamente. Los espectros de reflectancia medios obtenidos en función de la longitud de onda (nm) en el rango del infrarrojo cercano (1200 a 2200 nm) se muestran en la Figura 12 y Figura 13. En la Figura 12 se representa gráficamente los espectros de reflectancia para la miel adulterada con fructosa:glucosa y en la Figura 13 se representan los espectros de reflectancia obtenidos para las muestras adulteradas con miel de baja calidad.

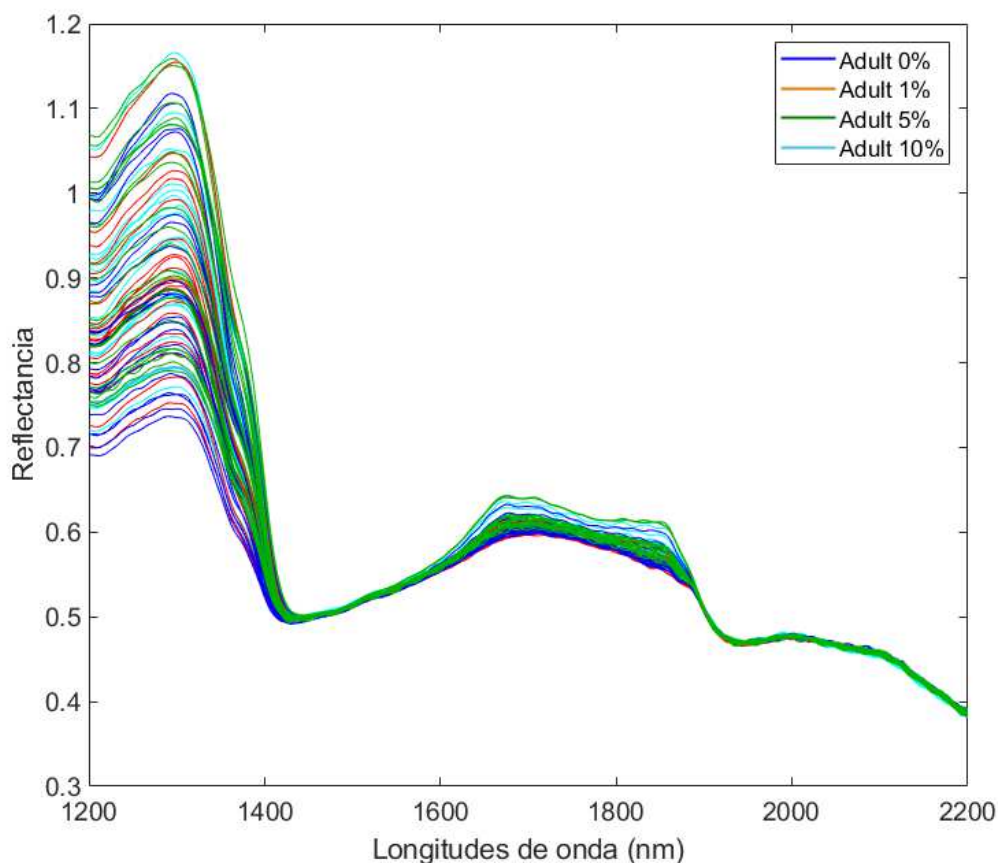


Figura 12. Espectros NIR de miel adulterada con fructosa:glucosa.

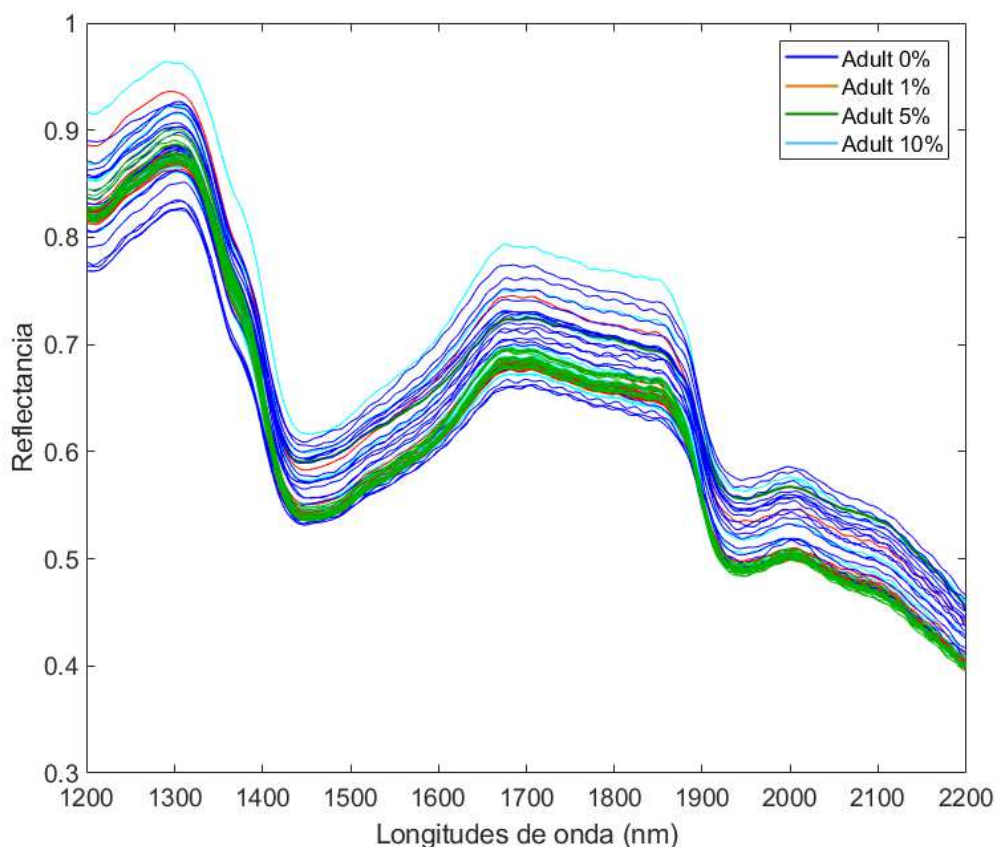


Figura 13. Espectros NIRS de miel adulterada con miel de baja calidad.

A la vista de los gráficos obtenidos se puede apreciar como en general los patrones de los espectros obtenidos para cada tipo de adulterante empleado son muy similares, obteniendo valles y picos de reflectancia en longitudes de onda similares en cada caso. Para el caso de los espectros obtenidos de la miel adulterada con fructosa:glucosa, incluso los valores de magnitud de la reflectancia son muy similares entre sí, no pudiéndose identificar valores característicos o diferenciales a simple vista. Este comportamiento sin embargo no parece repetirse en los espectros obtenidos para las muestras de miel adulterada con miel de baja calidad, donde se aprecian diferencias importantes en los valores de reflectancia obtenidos en función del nivel de adulteración de la muestra para los mismos valores de longitud de onda.

Por un lado se observa en ambas figuras como los espectros obtenidos en todas las muestras están bastante superpuestos, siendo especialmente acentuado en el grupo de muestras adulteradas con fructosa:glucosa, estando incluso muchos espectros superpuestos de tal

modo que no se aprecia visualmente diferencia entre ellos. Por esta razón, se requiere del uso de técnicas quimiométricas que nos permita obtener la información relevante de los espectros obtenidos.

Por otro lado, otra diferencia significativa que se observa a la vista de los espectros obtenidos es que los valores de reflectancia difieren para cada tipo de adulterante estudiado. Para las muestras de miel adulterada con fructosa:glucosa, los valores de reflectancia en general están en el rango de 0,40 a 1,15. Sin embargo, para las muestras adulteradas con miel de baja calidad, los valores de reflectancia obtenidos fluctúan en general en el rango más estrecho de 0,4 a 0,95.

Los espectros NIR de los alimentos comprenden amplias bandas derivadas de la superposición de absorciones correspondientes a sobretonos principalmente y a combinaciones de modos de vibración que implican enlaces químicos del tipo: C-H, O-H y N-H (Osborne, B. G., Fearn, T., & Hindle, P. T., 1993). Las bandas de combinación pueden corresponder a más de dos vibraciones diferentes. Sin embargo, estas vibraciones deben corresponder al mismo grupo funcional y deben tener la misma simetría. Además, en los espectros de reflectancia NIR las bandas de absorción de las moléculas que componen la muestra se describen como valles en lugar de picos, ya que la absorbancia es igual a $\text{Log}(1/\text{Reflectancia})$. Los espectros de la miel obtenidos en el estudio muestran las bandas características alrededor de 1452 nm, 1767 nm, 1938 nm, 2103 nm, 2271 nm y 2323 nm. 1452 nm corresponde al primer sobretono del tramo O – H; 1767 nm está asociado al primer sobretono del grupo CH₂; 1938 nm es una combinación de banda de estiramiento y flexión O – H; 2103 nm pertenece a una combinación de banda de deformación O – H y banda de estiramiento C – O; 2271 nm es una combinación de estiramiento C – H y banda de deformación, y 2323 nm es una combinación de estiramiento y banda de deformación de CH₂. Las bandas de absorción obtenidas en el presente estudio son similares a las reportadas por otros estudios similares sobre la miel (Chen et al., 2011).

3.2.- ANALISIS PLS-DA

Se desarrollaron dos modelos PLS-DA, uno para cada tipo de adulterante empleado (fructosa:glucosa y miel de baja calidad).

Se aplicó el análisis PLS-DA a cada conjunto de datos para construir un modelo capaz de diferenciar la miel pura de la miel adulterada y poder así valorar la efectividad de la espectroscopia NIR a la hora de predecir si diferentes muestras de miel se corresponden con miel pura o miel adulterada. Durante la fase previa de construcción del modelo, se llevó a cabo el pretratamiento de los datos para eliminar los efectos no informativos de la dispersión de la luz o el ruido del sistema. En concreto para el desarrollo de ambos modelos, se evaluaron diferentes técnicas de pretratamiento de datos: Ninguna, Corrección de la dispersión Multiplicativa (MSC), Centrado de Datos (Mean Center), Variable Normalizada eStándar (SNV), primera derivación (1st D), segunda derivación (2nd D) y varias combinaciones entre ellas. Para cada modelo creado se eligió la combinación óptima de pretratamiento evaluándose este teniendo en cuenta tasa de muestras correctamente clasificadas (%CC) en la validación externa, la sensibilidad y la especificidad. Resultó que tras ningún pretratamiento aplicado sobre los datos, se obtuvo el modelo con mayor tasa de muestras correctamente clasificadas (%CC) para la clasificación tanto del grupo de miel adulterada con fructosa:glucosa como para el grupo de miel adulterada con miel de baja calidad. En la Tabla 1 se muestra para cada técnica de pretratamiento de datos aplicado, el número de muestras empleadas, la varianza explicada, el número de variables latentes utilizadas para la construcción del modelo y la tasa de muestras correctamente clasificadas (%CC) para cada tipo de adulterante ensayado. Los valores en negrita corresponden con % CC más alto para cada tipo de adulterante ensayado.

Tabla 1. Número de muestras (n), % varianza explicada (v), número de variables latentes (LV) y %CC obtenidos en los modelos PLS-DA de muestras de miel.

Técnica pretratamiento	Modelo miel adulterada con fructosa:glucosa				Modelo miel adulterada con miel de baja calidad			
	n	v	LV	%CC	n	v	LV	%CC
Ninguna	55	100,00	7	90,63	54	100,00	4	79,63
MC	55	99,94	4	70,91	56	99,90	5	70,80
MSC+MC	55	99,61	4	74,55	55	99,47	4	74,55
SNV+MC	55	99,61	4	74,55	53	99,40	4	73,58
1st D+MC	53	97,99	4	70,89	56	98,93	5	73,21

2nd D+MC	53	51,85	4	50,94	50	96,51	3	52,00
MSC+1st D+MC	55	93,26	4	58,18	55	90,26	4	58,18
MSC+2nd D+MC	53	35,41	2	41,51	49	9,39	1	34,69
SNV+1st D+MC	55	91,22	3	50,91	55	96,11	5	74,55
SNV+2nd D+MC	53	35,34	2	41,51	53	9,54	1	45,28

Por lo tanto, para las muestras de miel adulteradas con fructosa:glucosa, el modelo de clasificación obtenido sin aplicar ninguna técnica de pretratamiento de datos arrojó un 90,63% de muestras clasificadas correctamente, tomando 7 variables latentes que explicaban el 100% de la varianza de datos acumulada. Del mismo modo, para el grupo de muestras de miel adulteradas con miel de baja calidad, el modelo de calibración obtenido sin aplicar ninguna técnica de pretratamiento de datos proporcionó un 79,63% de muestras correctamente clasificadas, considerando en este caso 4 variables latentes que explicaban una varianza acumulada de 100%.

Para el resto de los modelos de calibración realizados tomando diferentes combinaciones de pretratamiento de datos, los valores de %CC obtenidos fueron bastante inferiores no llegando en ningún caso a superar el 75%.

Cabe destacar los resultados relativos a la varianza explicada anormalmente bajos obtenidos para todos los pretratamientos realizados con la técnica de segunda derivación, tanto para el grupo de muestras adulteradas con fructosa:glucosa como para el grupo de muestras adulteradas con miel de baja calidad.

En la matriz de confusión obtenida para cada grupo de muestras (Tabla 2 para el grupo de muestras adulteradas con fructosa:glucosa y Tabla 3 para el grupo de muestras adulteradas con miel de baja calidad), las columnas representan los grupos reales a los que pertenecen las muestras (según los distintos niveles de adulteración) y las filas, el grupo que estima el modelo. De este modo, en la diagonal de la tabla se encuentran los porcentajes de las muestras que se clasifican correctamente.

Tabla 2. Matriz de confusión para el modelo PLS-DA para grupo de muestras adulteradas con fructosa:glucosa en la validación externa.

		Grupo real (%)			
		Adulter. 0%	Adulter. 1%	Adulter. 5%	Adulter. 10%
Grupo estimado (%)	Adulter. 0%	100,0	0,00	0,00	0,00
	Adulter. 1%	0,00	84,62	8,33	0,00
	Adulter. 5%	0,00	15,38	66,67	20,0
	Adulter. 10%	0,00	0,00	25,00	80,00

Tabla 3. Matriz de confusión para el modelo PLS-DA para grupo de muestras adulteradas con miel de baja calidad en la validación externa.

		Grupo real (%)			
		Adulter. 0%	Adulter. 1%	Adulter. 5%	Adulter. 10%
Grupo estimado (%)	Adulter. 0%	69,23	35,71	7,69	0,00
	Adulter. 1%	15,38	64,29	0,00	0,00
	Adulter. 5%	15,38	0,00	84,62	0,00
	Adulter. 10%	0,00	0,00	7,69	100,00

A la vista de los resultados podemos decir que en general los valores de muestras clasificadas correctamente por los modelos obtenidos son muy elevados en ambos grupos.

Por un lado, tenemos que el modelo obtenido para el grupo de muestras adulteradas con fructosa:glucosa se observa como para el nivel de adulteración 0%, es decir, miel sin adulterar, se obtiene un 100% de clasificación correcta de las muestras, por lo que este modelo es capaz de diferenciar estadísticamente las muestras que están adulteradas de las que no lo están (independientemente del nivel de adulteración de estas). Este resultado es ciertamente relevante ya que queda así evidenciado que la tecnología NIRS en combinación

con la quimiometría aplicada es capaz de diferenciar en el 100% de los casos la miel pura de la miel adulterada, al menos cuando esta se encuentra adulterada con más del 1% en peso con fructosa:glucosa. Así mismo se observa como este modelo cuando falla en la clasificación de las muestras de miel adulteradas, lo hace clasificando en un nivel de adulteración superior o inferior respecto del nivel de adulteración real. Esta circunstancia refuerza si cabe el buen grado de precisión del modelo ya que cuando falla en la clasificación de una muestra adulterada, lo hace clasificando como un nivel de adulteración muy parecido, no provocando clasificación de muestras que cuantitativamente tienen un valor de adulteración muy diferente entre ellas. El grupo de adulteración del 5% en peso es el grupo que peor grado de clasificación correcta obtiene con un 66,67% de las muestras clasificadas correctamente. Cabe destacar como aspecto negativo que un elevado porcentaje (25%) de muestras del grupo de adulteración 5% se clasificaron erróneamente como grupo adulteración 10%.

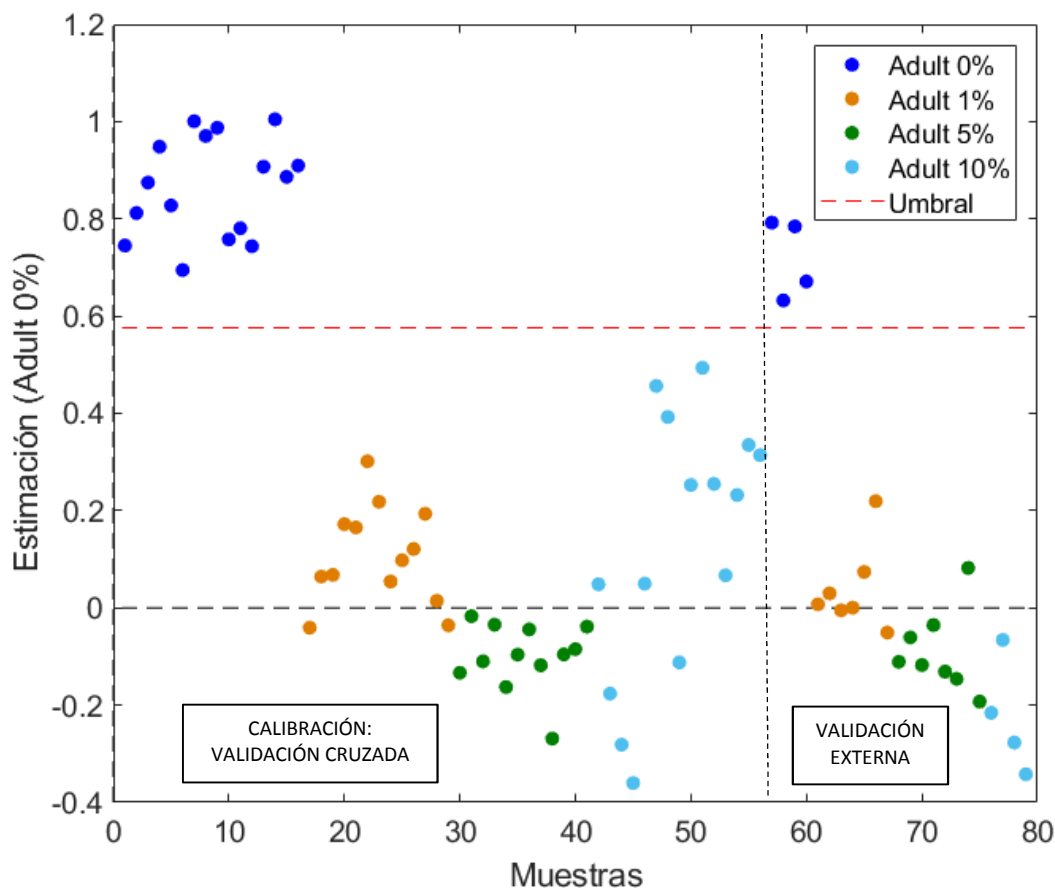


Figura 14. Resultados del modelo PLS-DA para los cuatro grupos de adulteración con fructosa:glucosa. Estimación para el grupo Adulteración 0%.

En la Figura 14 se muestra gráficamente los resultados de la validación cruzada (modelo de calibración) como los de la validación externa (modelo de predicción), realizada para los cuatro niveles de adulteración de la miel del grupo correspondiente al adulterante fructosa:glucosa. La línea horizontal roja discontinua indica el umbral por encima del cual una muestra es asignada a un grupo concreto, correspondiendo en este caso a las clasificadas como grupo adulteración 0%, donde se observa como todas las muestras quedan posicionadas por encima de dicho umbral y por lo tanto correctamente clasificadas al 100%.

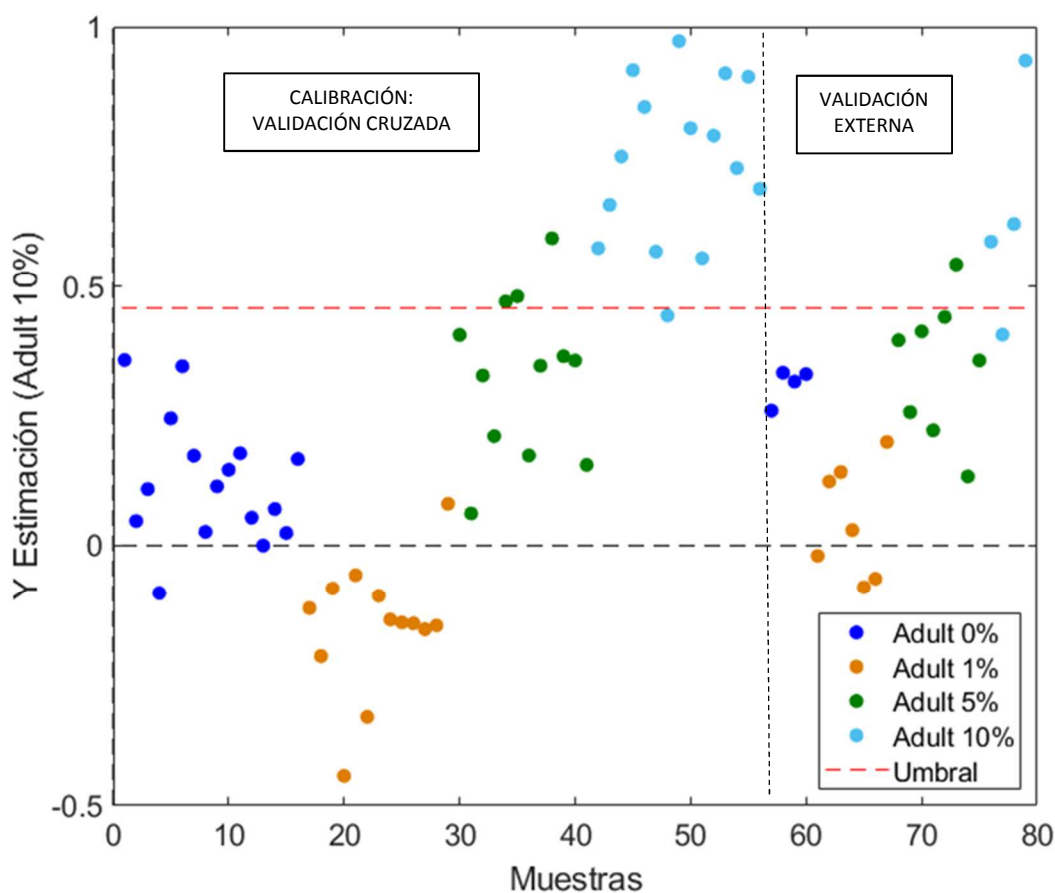


Figura 15. Resultados del modelo PLS-DA para los cuatro grupos de adulteración con fructosa:glucosa. Estimación para el grupo Adulteración 10%.

La Figura 15 representa los resultados de la validación cruzada (modelo de calibración) como los de la validación externa (modelo de predicción), realizada para los cuatro niveles de adulteración de la miel del grupo correspondiente al adulterante fructosa:glucosa, pero correspondiendo en este caso a las clasificadas como grupo adulteración 10%. Se observa

cómo no todas las muestras se clasifican correctamente ya que por encima de la línea umbral roja, además de no aparecer todas las muestras del grupo adulteración 10% se posicionan muestras con nivel de adulteración 5%, tanto en la calibración como en la validación externa.

Por otro lado, tenemos que el modelo para el grupo de muestras adulteradas con miel de baja calidad, el máximo valor de muestras clasificadas correctamente se obtiene para el nivel de adulteración del 10%, donde se obtiene un 100% de clasificación correcta. Sin embargo, para el nivel de adulteración 0%, es decir miel sin adulterar, se obtiene un valor del 69,23% de muestras que siendo realmente sin adulterar se clasifican correctamente como tal. En contraposición con el modelo anterior, en este caso no todas las muestras que son realmente sin adulterar se clasifican como tal ya que un 15,38% de ellas se clasifican erróneamente como adulteradas al 1% y un 15,38% también se clasifican erróneamente como adulteradas al 5%. Por lo tanto, además de clasificar un 30,76% de las muestras que realmente son de miel pura como miel adulterada, lo hace saltando dos niveles de adulteración, por lo que se podría decir que este modelo posee una menor precisión a la hora de diferenciar muestras de miel pura respecto muestras de miel adulterada con miel de baja calidad. Se observa como este modelo, para muestras con nivel de adulteración 0% y 5% clasifica erróneamente con salto cuantitativo de dos niveles de adulteración, aunque si bien es cierto que en porcentajes relativamente bajos. Por todo esto, se podría decir que, para el grupo de muestras adulteradas con miel de baja calidad, la tecnología NIRS en combinación con la quimiometría, aun siendo efectiva no es tan precisa a la hora de detectar diferencias, obteniéndose un modelo de calibración que sí se puede considerar preciso cuando el nivel de adulteración de la miel es del 10 % en peso o superior. Esto podría deberse a que probablemente el adulterante empleado (miel de baja calidad) posee una composición química muy similar a la de la miel pura, lo que hace que la detección de los componentes químicos diferenciales sea más difícil que para el caso de adulteración con fructosa:glucosa, sugiriéndose así que es necesario la presencia de mayor cantidad de adulterante para que se pueda detectar la diferencia espectral suficiente para clasificar como diferentes las muestras de miel pura respecto de las muestras adulteradas.

La precisión de los modelos de clasificación PLS-DA obtenidos se evaluó en función de los valores de sensibilidad y especificidad resultantes para cada nivel de adulteración. En la Tabla 4 se recogen los valores obtenidos de sensibilidad y especificidad obtenidos para los modelos de calibración. Se muestran únicamente estos valores para cada uno de los modelos de cada grupo de muestras que mejores resultados de clasificación obtuvieron en términos de %CC.

Tabla 4. Valores de sensibilidad y especificidad obtenidos en cada modelo de predicción para cada grupo de muestras.

Nivel adulteración	Grupo 1: Adulteración con Fructosa:Glucosa		Grupo 2: Adulteración con miel de baja calidad	
	SENSIBILIDAD	ESPECIFICIDAD	SENSIBILIDAD	ESPECIFICIDAD
	Nivel 0%	1,000	0,947	1,000
Nivel 1%	1,000	1,000	0,667	0,611
Nivel 5%	1,000	0,733	1,000	1,000
Nivel 10%	0,750	1,000	1,000	0,889

A la vista de los datos presentados en la Tabla 4, dentro del grupo 1 se observa cómo se obtienen valores mayores (más próximo al valor de 1,00) de sensibilidad y especificidad que dentro del grupo 2. Este aspecto refleja que la precisión a la hora de predecir a que grupo de nivel de adulteración pertenece una muestra analizada es superior en el modelo obtenido en el grupo 1 (adulteración con fructosa:glucosa) que en el modelo obtenido en el grupo 2 (adulteración con miel de baja calidad).

Dentro del grupo 1, en el caso de nivel de adulteración 0%, es decir miel sin adulterar, todas las muestras fueron clasificadas correctamente en su grupo y por lo tanto el valor de sensibilidad y especificidad es de 1.

Dentro del grupo 2, se observa como prácticamente los mayores valores de sensibilidad y especificidad se obtienen para el nivel de adulteración de 10%.

De acuerdo con los resultados obtenidos en todos los modelos de clasificación PLS-DA desarrollados se puede decir que, en general, se detecta con mayor grado de precisión la adulteración de la miel cuando el adulterante empleado es fructosa:glucosa, siendo capaz de clasificar correctamente el 100% de las muestras incluso con niveles de adulteración muy bajos (1% de adulterante en peso). Por otro lado, cuando el adulterante empleado es la miel

de baja calidad, es más difícil detectar la adulteración, siendo necesario llegar a cuantías de adulterante del al menos 10% en peso para que se llegue a clasificar correctamente el 100% de las muestras adulteradas.

En un estudio desarrollado sobre la determinación de la adulteración de la miel china con jarabe de maíz de alta fructosa (JMAF) mediante el uso de tecnología NIR en combinación con técnicas quimiométricas (Chen et al., 2011), se construyeron modelos discriminantes de mínimos cuadrados parciales (DPLS) para distinguir entre muestras de miel adulteradas y muestras de miel no adulteradas obteniendo una tasa de clasificación correcta del 100% para las muestras no adulteradas y una tasa del 95 % para las muestras adulteradas con un pretratamiento de datos de primera derivación y centrado de datos (1 st D + MC). Este trabajo consideró unos niveles de adulteración con JMAF que varió del 7% al 59% (p/p). Estos resultados van en consonancia con los obtenidos en el presente estudio, aunque difieren en el modelo de clasificación desarrollado, el tipo de adulterante empleado y especialmente en el porcentaje de adulteración de la miel, tomando valores muy superiores a los considerados en este trabajo.

Así mismo, en otro estudio realizado para la detección de adulterantes en la miel mediante espectroscopia y técnicas quimiométricas en el infrarrojo cercano (Zhu et al., 2010), se analizaron varios modelos de clasificación diferentes; vectores de soporte de mínimos cuadrados (LS-SVM), vectores de soporte (SVM), red neuronal artificial de retropropagación (BP-ANN), análisis discriminante lineal (LAD) obteniendo que LS-SVM fue el que mejor resultados proporcionó con una precisión del 95,1%. Al igual que en el presente estudio, se empleó como adulterante una mezcla de fructosa:glucosa pero en varios niveles de proporción de mezcla y para cada proporción se analizaron cuatro niveles de adulteración: 7, 14, 21 y 28%. Los resultados obtenidos demostraron que la tecnología NIRS tiene la capacidad de detectar adulterantes de azúcar en la miel, con un elevado grado de precisión.

Más recientemente, Ferreiro-gonzález et al., (2018), en su trabajo sobre la cuantificación de la adulteración de la miel mediante espectroscopia visible-infrarrojo cercano (Vis-NIRS) en el rango de 400-2.500 nm combinada con quimiometría, utilizó para discriminación de la miel adulterada diferentes muestras de miel multifloral Denominación de Origen Protegida de Granada adulteradas con jarabe de maíz de alto contenido en fructosa (JMAF) en diferentes porcentajes (en el rango del 10% al 90% en incrementos del 10%). Los autores obtuvieron que el mejor modelo de predicción desarrollado fue el análisis discriminante lineal (LDA) que

llegó a discriminar correctamente entre los nueve niveles de adulteración ensayados en el 100% de las muestras analizadas. Este estudio volvió a reportar que la tecnología NIRS presenta una buena capacidad para detectar adulterantes de azúcar en la miel con una elevada precisión.

4. CONCLUSIONES

En este estudio se ha investigado la viabilidad de la espectroscopia NIRS para detectar la presencia de adulterantes en la miel. Se emplearon dos tipos de adulterantes diferentes, mezcla de azúcares de fructosa:glucosa y miel de baja calidad, en diferentes niveles de adulteración (1%, 5% y 10%). Se llevó a cabo un enfoque quimiométrico multivariante a fin de determinar qué técnica de procesamiento de datos era la más efectiva a la hora de desarrollar el modelo de predicción más preciso y robusto a la hora de discriminar las muestras de miel adulteradas. Los resultados obtenidos sugieren:

- Los modelos PLS-DA desarrollados para la clasificación de las muestras de miel según sus espectros NIR, obtuvieron un porcentaje de muestras correctamente clasificadas del 90,63% para el grupo de adulterante azúcar de fructosa:glucosa y del 79,63% para el grupo de adulterante miel de baja calidad.
- El modelo PLS-DA elaborado para el grupo de adulterante azúcar de fructosa:glucosa obtuvo una discriminación del 100% de las muestras adulteradas, independientemente del nivel de adulteración, respecto de las muestras no adulteradas.
- De todas las técnicas de pretratamiento de datos espectrales que se analizaron para reducir la dispersión de datos y el ruido de los equipos, fue la técnica de promedio de datos únicamente la que arrojó los mejores resultados en términos de porcentaje de muestras correctamente clasificadas (%CC) para ambos grupos de adulterante estudiados.
- Comparando los dos tipos de adulterantes estudiados, los mejores resultados de clasificación en términos de robustez y precisión de los modelos de clasificación desarrollados se dieron para el adulterante de azúcar fructosa:glucosa, por lo que la tecnología NIR es más efectiva discriminando muestras adulteradas con azúcar fructosa:glucosa que discriminando muestras adulteradas con miel de baja calidad.
- Respecto al nivel de adulteración estudiado, los mejores resultados en términos de muestras correctamente clasificadas se obtuvieron para el adulterante azúcar de fructosa:glucosa, discriminando correctamente el 100% de las muestras adulteradas con niveles de adulteración del 1% o superior, mientras que para el adulterante miel

de baja calidad, el 100% de muestras clasificadas correctamente se obtuvo con el nivel de adulteración del 10%.

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que la aplicación de la tecnología NIRS en combinación con las técnicas de quimiometría de análisis supervisado mediante PLS-DA es efectiva en la detección de adulterantes de la miel y por tanto puede ser una buena herramienta para el análisis de control de rutina en la industria agroalimentaria ya que es un método no destructivo, de fácil uso y económico. Esta tecnología es por consiguiente una herramienta muy efectiva que permite desarrollar modelos de control para la protección contra el fraude por adulteración de la miel en sistemas locales de producción. Sin embargo, debido a la gran variabilidad de tipos de miel existentes en cuanto a origen geográfico, botánico, edafológico, etc, y la gran diversidad de adulterantes que en los últimos años se van incorporando en la industria de la miel, requiere que se sigan desarrollando nuevos estudios para desarrollar modelos más robustos, globales y precisos para conseguir que la tecnología NIR sea efectiva a nivel global tal y como precisa el modelo de la industria agroalimentaria actual.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bergera, G., Jarén, C., & Arana, I. (2006). Instrumentación para la espectroscopía de infrarrojo cercano. *Horticultura: Revista de Industria, Distribución Y Socioeconomía Hortícola: Frutas, Hortalizas, Flores, Plantas, Árboles Ornamentales Y Viveros*. 194, 30-33.

Cavia, M., Ferna, M. A., & Huidobro, F. (2007). Food Chemistry Evolution of acidity of honeys from continental climates: Influence of induced granulation, 100, 1728–1733. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.10.019>

Chen, L., Wang, J., Ye, Z., Zhao, J., Xue, X., & Vander, Y. (2012). Classification of Chinese honeys according to their floral origin by near infrared spectroscopy. *FOOD CHEMISTRY*, 135(2), 338–342. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.156>

Chen, L., Xue, X., Ye, Z., Zhou, J., Chen, F., & Zhao, J. (2011). Determination of Chinese honey adulterated with high fructose corn syrup by near infrared spectroscopy. *Food Chemistry*, 128(4), 1110–1114. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.10.027>

Ciulu, M., Solinas, S., Floris, I., Panzanelli, A., Pilo, M. I., Piu, P. C., ... Sanna, G. (2011). Talanta RP-HPLC determination of water-soluble vitamins in honey. *Talanta*, 83(3), 924–929. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2010.10.059>

Da Silva, P. M., Gauche, C., Gonzaga, L. V., Costa, A. C. O., & Fett, R. (2016). Honey: Chemical composition, stability and authenticity. *Food Chemistry*, 196, 309–323. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.09.051>

Escriche, I., Kadar, M., Juan-borrás, M., & Domenech, E. (2014). Suitability of antioxidant capacity, flavonoids and phenolic acids for floral authentication of honey. Impact of industrial thermal treatment. *Food Chemistry*, 142, 135–143. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.07.033>

Escuredo, O., Míguez, M., Fernández-González, M., & Carmen Seijo, M. (2013). Nutritional value and antioxidant activity of honeys produced in a European Atlantic area. *Food Chemistry*, 138(2–3), 851–856. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.11.015>

Ferreiro-gonzález, M., Espada-bellido, E., Guillén-cueto, L., Palma, M., Barroso, C. G., & Barbero, G. F. (2018). Talanta Rapid quantification of honey adulteration by visible-near infrared spectroscopy combined with chemometrics. *Talanta*, 188(March), 288–292. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.05.095>

Gan, Z., Yang, Y., Li, J., Wen, X., Zhu, M., & Jiang, Y. (2016). Using sensor and spectral analysis to classify botanical origin and determine adulteration of raw honey. *Journal of Food Engineering*, 178, 151–158. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2016.01.016>

Guelpa, A., Marini, F., Slabbert, R., & Manley, M. (2017). Verification of authenticity and fraud detection in South African honey using NIR spectroscopy. *Food Control*, 73, 1388–1396. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.11.002>

Iglesias, M. T., Martín-Álvarez, P. J., Polo, M. C., De Lorenzo, C., González, M., & Pueyo, E. (2006). Changes in the free amino acid contents of honeys during storage at ambient temperature. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(24), 9099–9104. <https://doi.org/10.1021/jf061712x>

Lammertyn, J., Peirs, A., Baerdemaeker, J. De, & Nicolai, B. (2000). Light penetration properties of NIR radiation in fruit with respect to non-destructive quality assessment, 18, 121–132.

Latorre, C. H., Crecente, R. M. P., Martín, S. G., & García, J. B. (2013). A fast chemometric procedure based on NIR data for authentication of honey with protected geographical indication. *Food Chemistry*, 141(4), 3559–3565. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.06.022>

López-maestresalas, A., Insausti, K., Jarén, C., Pérez-roncal, C., Urrutia, O., Jose, M., & Arazuri, S. (2019). Detection of minced lamb and beef fraud using NIR spectroscopy. *Food Control*, 98(October 2018), 465–473. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.12.003>

López Maestresalas, A. (2016). *Near-infrared spectroscopy and hyperspectral imaging for non-destructive quality inspection of potatoes. Tesis Doctoral. Universidad Pública de Navarra.*

Moreira, R. F. A., Maria, C. A. B. De, Pietroluongo, M., & Trugo, L. C. (2010). Chemical changes in the volatile fractions of Brazilian honeys during storage under tropical conditions.

Food Chemistry, 121(3), 697–704. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.01.006>

Naila, A., Flint, S. H., Sulaiman, A. Z., Ajit, A., & Weeds, Z. (2018). Classical and novel approaches to the analysis of honey and detection of adulterants. *Food Control*, 90, 152–165. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.02.027>

Nicola, B. M., Beullens, K., Bobelyn, E., Peirs, A., Saeys, W., Theron, K. I., & Lammertyn, J. (2007). Nondestructive measurement of fruit and vegetable quality by means of NIR spectroscopy : A review, 46, 99–118. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2007.06.024>

Pasquini, C. (2018). Analytica Chimica Acta Near infrared spectroscopy : A mature analytical technique with new perspectives e A review. *Analytica Chimica Acta*, 1026, 8–36. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.04.004>

Pegueru Gutierrez, A. (2010). *La espectroscopia NIR en la determinación de propiedades físicas y composición química de intermedios de producción y productos acabados. Tesis Doctoral, Universidad Autónoma de Barcelona.*

Qu, J., Liu, D., Cheng, J., Pu, H., & Zeng, A. (2015). Applications of Near-infrared Spectroscopy in Food Safety Evaluation and Control: A Review of Recent Research Advances Applications of Near-infrared Spectroscopy in Food Safety Evaluation and Control : A Review of Recent Research Advances, 8398. <https://doi.org/10.1080/10408398.2013.871693>

Se, K. W., Wahab, R. A., Yaacob, S., & Krishna, S. (2019). Journal of Food Composition and Analysis Detection techniques for adulterants in honey: Challenges and recent trends, 80(April), 16–32. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2019.04.001>

Serrano, S., Villarejo, M., Espejo, R., & Jodral, M. (2004). Chemical and physical parameters of Andalusian honey: Classification of Citrus and Eucalyptus honeys by discriminant analysis. *Food Chemistry*, 87(4), 619–625. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.01.031>

Tahsin, M., Berna, N., Said, O., Karaman, S., Dertli, E., Sagdic, O., & Arici, M. (2014). Steady , dynamic and creep rheological analysis as a novel approach to detect honey adulteration by fructose and saccharose syrups : Correlations with HPLC-RID results. *FRIN*, 64, 634–646. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.07.009>

Tornuk, F., Karaman, S., Ozturk, I., Said, O., Tastemur, B., & Sagdic, O. (2013). Quality characterization of artisanal and retail Turkish blossom honeys: Determination of physicochemical , microbiological , bioactive properties and aroma profile. *Industrial Crops & Products*, 46, 124–131. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.12.042>

Wu, L., Du, B., Vander, Y., Chen, L., Zhao, L., Wang, M., & Xue, X. (2017). Trends in Analytical Chemistry Recent advancements in detecting sugar-based adulterants in honey e A challenge. *Trends in Analytical Chemistry*, 86, 25–38. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.10.013>

Zhu, X., Li, S., Shan, Y., Zhang, Z., Li, G., Su, D., & Liu, F. (2010). Detection of adulterants such as sweeteners materials in honey using near-infrared spectroscopy and chemometrics, 101, 92–97. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.06.014>