

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



**TESIS DOCTORAL**

**Espectroscopía de plasma inducido y fluorescencia  
molecular en el control de calidad de los alimentos**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Miguel Lastra Mejías**

Director

**José Santiago Torrecilla Velasco**

**Madrid**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

**Departamento de Ingeniería Química y de Materiales**



**TESIS DOCTORAL**

**Espectroscopia de plasma inducido y fluorescencia  
molecular en el control de calidad de los alimentos**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Miguel Lastra Mejías**

Director

Dr. José Santiago Torrecilla

Madrid, 2019





UNIVERSIDAD  
COMPLUTENSE  
MADRID

**DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS  
PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR**

D./Dña. Miguel Lastra Mejías, estudiante en el Programa de Doctorado D9BN – Ingeniería Química, de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de Madrid, como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y titulada:

Espectroscopía de plasma inducido y fluorescencia molecular en el control de calidad de los alimentos

y dirigida por: José Santiago Torrecilla Velasco

**DECLARO QUE:**

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita.

Del mismo modo, asumo frente a la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Madrid, a 08 de octubre de 2019

Fdo.: 

Esta DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD debe ser insertada en la primera página de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor.



## **Agradecimientos**

Al final llegó el día en que acaba este ciclo, lleno de muy buenos momentos y de donde me llevo gente maravillosa. No son amigos, sino una familia que echaré de menos porque gracias a ellos los días se hacían amenos. Me refiero a mi grupo de investigación: Manuel (mi bro), Ester, Regina, John y Albertina. También a las personas de la facultad como Jesús, Antonio, Victoria (mil gracias por esa portada), Cristina y demás compañeros que han estado ahí siempre que se han requerido, por sus consejos, intercambio de ideas y por las muchas risas. Agradecer a Sara por los días incansables intentando poner a punto el láser, ¡qué rebelde! Gracias a mi director de tesis, que creyó en mí y me apoyó en las decisiones difíciles, ¡eres grande! A Gemma, una persona que merece la pena conocer y jamás perder, ¡porque vales mucho! A mis amigos por estar cuando las circunstancias lo requerían.

Esta tesis se la quiero dedicar a mi familia, por el apoyo incondicional en todo lo que he realizado y que no hubiese llegado hasta aquí sino fuese por ellos, ¡os debo mucho! A Cynthia, mi compañera de viaje, que espero que esta sea una de las muchas aventuras que comparta a tu lado. A todos ellos muchas gracias.



# Índice

<b>Resumen</b> .....	<b>15</b>
<b>Summary</b> .....	<b>17</b>
<b>1. Introducción</b> .....	<b>21</b>
1.1 Calidad alimentaria .....	21
1.1.1 Seguridad alimentaria .....	23
1.1.2 Adulteración alimentaria.....	24
1.1.3 Etiquetado y Denominación de Origen Protegido .....	26
1.1.4 Química Analítica y quimiometría .....	27
1.2 Radiación láser .....	<b>28</b>
1.2.1 Historia del láser y sus aplicaciones .....	28
1.2.2 Definición de láser .....	31
1.2.3 Características físicas de la emisión láser .....	32
1.2.4 Componentes de un láser .....	34
1.2.5 Tipos de láser.....	38
1.2.6 Fluorescencia.....	39
1.2.6.1 Láser continuo .....	40
1.2.7 Emisión atómica .....	42
1.2.7.1 Láser pulsado (Nd:YAG) .....	42
1.2.7.2 Espectroscopia de plasma inducido por láser .....	44
1.2.7.3 Ablación láser .....	46
1.3 Quimiometría .....	<b>48</b>
1.3.1 Modelos Lineales.....	48
1.3.1.1 Método de los K vecinos más próximos .....	48
1.3.1.2 Modelo de regresión multiparamétrico .....	48
1.3.2 Modelos no Lineales.....	49
1.3.2.1 Redes neuronales artificiales .....	49
1.3.2.2 Caos .....	50
1.4 LabVIEW .....	<b>51</b>
1.5 Objetivos .....	<b>54</b>
<b>2. Materiales y métodos</b> .....	<b>59</b>
2.1 Alimentos analizados.....	59

2.1.1 Aceite de oliva virgen extra .....	59
2.1.2 Miel.....	65
2.1.3 Vinagre .....	72
2.2 Descripción de los equipos usados .....	75
2.2.1 Láser pulsado .....	75
2.2.2 Láser continuo .....	79
2.3 LabVIEW .....	82
<b>3. Resultados .....</b>	<b>85</b>
3.1 Láser pulsado.....	85
3.1.1 Clasificación y detección de adulteraciones en la miel.....	88
3.2 Láser Continuo.....	103
3.2.1 Caracterización de las mieles de origen español .....	103
3.2.2 Influencia del almacenamiento en la calidad de los AOVE .....	109
3.2.3 Adulteración del AOVE con denominación de origen protegida .....	119
3.2.4 Adulteración de vinagre con DOP .....	132
3.3 Comparación láser pulsado y continuo .....	140
<b>4. Conclusiones.....</b>	<b>143</b>
<b>5. Bibliografía .....</b>	<b>149</b>
<b>6. Anexos.....</b>	<b>161</b>

## Índice tablas

<b>Tabla 1.</b> Basada en el informe del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación del año 2017 sobre DOP e IGP en alimentos españoles.....	26
<b>Tabla 2.</b> Resumen de características de los diferentes aceites de oliva .....	63
<b>Tabla 3.</b> Aceites usados en la experimentación .....	64
<b>Tabla 4.</b> Composición de la miel. ....	65
<b>Tabla 5.</b> Parámetros de calidad de la miel de acuerdo con las normas del Codex Alimentarius y del concilio relativo a la miel de la UE. ....	68
<b>Tabla 6.</b> Tipos de mieles usadas en la experimentación. ....	71
<b>Tabla 7.</b> Tipos de vinagres usados en la experimentación. ....	74
<b>Tabla 8.</b> Cantidad de metales (mg/kg) encontrados en las mieles analizadas <sup>161</sup> . Las cantidades más altas están marcadas en negrita. ....	91
<b>Tabla 9.</b> Resumen de los resultados obtenidos por los kNNs según el umbral de la concentración de sirope de arroz en la clasificación de muestras adulteradas.....	101
<b>Tabla 10.</b> Resultados obtenidos en la clasificación de las muestras según la concentración de sirope de arroz, para cada variedad de miel examinada.....	102
<b>Tabla 11.</b> Tipos y marcas de miel (y sirope de arroz) usadas en la experimentación. ....	104
<b>Tabla 12.</b> Rango de longitudes de excitación/emisión compuestos fluorescentes presentes en la miel.....	108
<b>Tabla 13.</b> Aceites de oliva virgen extra usados en la experimentación.....	110
<b>Tabla 14.</b> HNN optimizado y coeficientes de aprendizaje (Lc, Lcd, Lci) de cada modelo MLP diseñado.....	116
<b>Tabla 15.</b> Rendimientos estadísticos de cada MLP desarrollado para clasificar muestras adulteradas mediante validación interna (VI) y validación cruzada k-fold (k=6). ....	117
<b>Tabla 16.</b> Rendimientos estadísticos de cada MLP desarrollado para determinar si el AOVE se almacenó en la oscuridad o bajo la luz del sol mediante validación interna (VI) y validación cruzada k-fold (k=6). ....	117
<b>Tabla 17.</b> Rendimientos estadísticos de cada MLP desarrollado para identificar el envase (vidrio incoloro o PET) en el que se almacenó el AOVE mediante validación interna (VI) y validación cruzada k-fold (k=6). ....	118
<b>Tabla 18.</b> Rendimientos estadísticos de cada MLP desarrollado para identificar el color del envase de vidrio (incoloro o marrón) en el que se almacenó el AOVE mediante validación interna (VI) y validación cruzada k-fold (k=6). ....	119
<b>Tabla 19.</b> Características principales de los AOVE utilizados. ....	120
<b>Tabla 20.</b> Fórmulas para calcular cada parámetro estadístico utilizado. ....	126
<b>Tabla 21.</b> Resultados estadísticos obtenidos para cada una de las mezclas binarias. ....	127
<b>Tabla 22.</b> Valores de los parámetros optimizados .....	130
<b>Tabla 23.</b> Rendimiento del modelo en las tres validaciones. ....	132
<b>Tabla 24.</b> Resultados y parámetros estadísticos de las MLPs optimizadas que utilizaron las variables independientes seleccionadas por RF en todo el espectro de fluorescencia. .	136
<b>Tabla 25.</b> Resultados estadísticos y parámetros de las MLPs optimizadas que utilizaron las variables independientes seleccionadas por RF de 450 a 650 nm. ....	136

**Tabla 26.** Resultados estadísticos y parámetros de las MLPs optimizadas que utilizaron las variables caóticas independientes seleccionadas por RF de todo el espectro de fluorescencia. ....137

**Tabla 27.** Resultados estadísticos y parámetros de las MLPs optimizadas que utilizaron las variables caóticas independientes seleccionadas por RF de 450 a 650 nm. ....138

**Tabla 28.** Comparación de los resultados estadísticos de las redes neuronales con/sin aplicación de parámetros caóticos en los diferentes intervalos de longitudes de onda.139

**Tabla 29.** Comparativa láser pulsado y continuo. ....140

## Índice figuras

<b>Figura 1.</b> Componentes del láser de rubí construido en 1960. ....	29
<b>Figura 2.</b> William Bennet y Ali Javan, creadores del láser de He-Ne. ....	29
<b>Figura 3.</b> Láser de CO <sub>2</sub> cortando placa una placa metálica .....	30
<b>Figura 4.</b> Proceso de emisión espontánea.....	31
<b>Figura 5.</b> Proceso de emisión estimulada.....	32
<b>Figura 6.</b> Propiedades de la luz láser. ....	32
<b>Figura 7.</b> Interior láser Nd:YAG, donde podemos observar el medio activo (cristal de Nd:YAG) y el sistema de bombeo, compuesto por una lámpara flash de Xe.....	34
<b>Figura 8.</b> Ejemplos de medios activos sólidos. ....	35
<b>Figura 9.</b> Sistemas láser de tres (A) y cuatro niveles (B).....	35
<b>Figura 10.</b> Esquema de emisión estimulada con inversión de población.....	36
<b>Figura 11.</b> Lámpara de flash de xenón.....	36
<b>Figura 12.</b> Láser de gas He-Ne. ....	37
<b>Figura 13.</b> Diagrama parcial de energía para un sistema fotoluminiscente (Diagrama de Jablonski).....	39
<b>Figura 14.</b> Unión p-n en semiconductores.....	41
<b>Figura 15.</b> Láser de Nd:YAG (marca Surelite).....	43
<b>Figura 16.</b> Niveles energéticos láser Nd:YAG.....	43
<b>Figura 17.</b> Proceso de generación del plasma. ....	45
<b>Figura 18.</b> Esquema de un sistema de LIBS. ....	46
<b>Figura 19.</b> Panel frontal con controles (flecha roja) e indicadores (flecha amarilla). ....	52
<b>Figura 20.</b> Diagrama de bloques con la representación del código fuente.....	53
<b>Figura 21.</b> Producción mundial de aceite de oliva en miles de toneladas. Datos de la campaña 2017/2018. Fuente: consejo oleícola internacional (COI). ....	62
<b>Figura 22.</b> Producción mundial de miel en el año 2017. Fuente: FAO. ....	67
<b>Figura 23.</b> Reacción de la enzima diastasa. ....	69
<b>Figura 24.</b> Reacción de deshidratación de glucosa y fructosa a HMF. ....	69
<b>Figura 25.</b> Esquema de la reacción de Maillard .....	70
<b>Figura 26.</b> Láser de Nd:YAG. Interior del láser: 1: Q-switch. 2: cabeza del láser con la varilla y la lámpara de bombeo. En la esquina superior izquierda se muestra el sistema cerrado. ....	76
<b>Figura 27.</b> Montaje experimental del láser pulsado (Nd:YAG).....	76
<b>Figura 28.</b> Plataforma de adquisición de medidas. ....	77
<b>Figura 29.</b> Láseres utilizados en la experimentación: diodo láser UV (A) y verde (B). ....	79
<b>Figura 30.</b> Interior del maletín que contiene el sistema basado en diodo láser. ....	80
<b>Figura 31.</b> Cubeta de cuarzo con una muestra de miel en su interior. ....	81
<b>Figura 32.</b> Panel frontal que permite configurar el láser. ....	82
<b>Figura 33.</b> Diagrama de bloques con el código fuente. ....	82
<b>Figura 34.</b> Espectro de emisión (LIBS; intensidad (unidades arbitrarias; u.a.) frente a longitud de onda; nm) correspondiente a una placa de acero. ....	86
<b>Figura 35.</b> Ablaciones láser en una moneda de 2 céntimos y su correspondiente espectro LIBS.....	86

<b>Figura 36.</b> Espectros LIBS correspondientes al AOVE, vinagre y vino. ....	87
<b>Figura 37.</b> Espectros comparativos entre pescado fresco (verde), calentado 2 horas a 25°C (amarillo) y la pieza degradada (rojo). ....	88
<b>Figura 38.</b> Espectro de emisión correspondiente a la miel de eucalipto para el espectrómetro con una ventana de 200 a 550 nm (A) y de 535 a 980 nm (B). Los picos se asignan a su elemento o molécula correspondiente. (I) indica átomos neutros mientras que (II) son átomos ionizados. ....	90
<b>Figura 39.</b> Espectros LIBS de las mieles puras analizadas de diferentes orígenes botánicos. Las posiciones de los metales considerados están marcadas (Ca, Na, K y Mg). ....	92
<b>Figura 40.</b> Origen de la miel de izquierda a derecha: naranja, castaño, eucalipto, multifloral, romero y limón. ....	92
<b>Figura 41.</b> Bandas de emisión LIBS ampliadas de (a) Mg, (b) Ca, (c) Na y (d) K en las mieles. Los colores de las líneas corresponden a mieles puras de diferentes orígenes botánicos: limón (amarillo), castaño (marrón), romero (rojo), multifloral (azul), eucalipto (verde) y naranja (naranja). El gráfico inferior es un ejemplo arbitrario de un espectro LIBS de la miel para mostrar dónde se encuentran las regiones amplificadas (a-d). ....	93
<b>Figura 42.</b> Espectros de emisión LIBS de miel pura y de romero adulterado con sirope de arroz a diferentes concentraciones. Se muestran las posiciones de Ca, Na, K y Mg. ....	95
<b>Figura 43.</b> Espectros de emisión de miel de limón (1) y miel multifloral (2). Las gráficas estarían representadas por miel pura (—), adulterada en un 2 % (—), 4 % (—) y 6 % (—). ....	95
<b>Figura 44.</b> Perfiles de los valores de autocorrelación calculados para cada una de las mieles. ....	98
<b>Figura 45.</b> Perfiles de los valores de autocorrelación calculados para la miel de limón adulterada con sirope de arroz (0 - 8 % en peso). ....	100
<b>Figura 46.</b> De izquierda a derecha: sirope de arroz, miel de romero, miel de acacia, miel de limón, miel de mil flores y miel de castaño. ....	104
<b>Figura 47.</b> Espectros de las mieles de Acacia (A), Mil Flores (B) y Romero (C). ....	106
<b>Figura 48.</b> Espectros de las mieles de Limón (D) y Castaño (E). ....	107
<b>Figura 49.</b> Espectros de emisión correspondientes al sirope de arroz puro medido con diodo UV (A) y verde (B). ....	108
<b>Figura 50.</b> Recipientes utilizados durante el ensayo ....	110
<b>Figura 51.</b> Esquema del almacenamiento de las muestras analizadas. ....	111
<b>Figura 52.</b> Espectros comparativos de Cornicabra pura (azul) y día 58 con luz (gris) y sin luz (naranja). ....	112
<b>Figura 53.</b> Espectro de emisión correspondiente al AOVE variedad Picual, adulterado en un 1 %, mantenido bajo luz (día 44) y almacenado en bote de cristal oscuro (naranja), plástico transparente (amarillo) y cristal transparente (azul). ....	113
<b>Figura 54.</b> Esquema de un perceptrón binario multicapa clasificador (topología: 4, 3, 1) que contiene cuatro variables independientes (entradas), tres neuronas ocultas y una variable dependiente categórica (salida u objetivo). ....	114
<b>Figura 55.</b> Espectro de absorbancia de una muestra de AOVE. ....	121

<b>Figura 56.</b> Espectros de emisión correspondientes a mezclas binarias de DOP en fecha con DOP fuera de fecha. Las señales de emisión 1 % corresponden a las líneas de color azul, 8 % al color rojo y 17 % las de color verde . . . . .	123
<b>Figura 57.</b> Espectros de fluorescencia pertenecientes a AOVE frescos y puros indicando posiciones de los máximos de emisión. Saqura (amarillo), Oleoestepa (verde oscuro) y Duque de Baena (verde claro) . . . . .	129
<b>Figura 58.</b> Espectros fluorescentes correspondientes a cada uno de los tipos de vinagres utilizados. Vinagre de jerez (rojo); vinagre de melaza (verde); vinagre de arroz (marrón); vinagre de sidra (amarillo); vinagre de vino blanco (azul). Las flechas indican los máximos de emisión. . . . .	133
<b>Figura 59.</b> Espectros de emisión de muestras adulteradas de vinagre de Jerez (azul) en un 2 % (naranja), 8 % (gris) y 15 % (amarillo) en peso con vinagre de arroz (a), vinagre de vino blanco (b) , vinagre de melaza (c) y vinagre de sidra (d). . . . .	134



## Resumen

### *Espectroscopía de plasma inducido y fluorescencia molecular en el control de calidad de los alimentos*

La industria alimentaria es un sector en continua evolución, con un gran volumen tanto en importaciones como en exportaciones entre países, siendo susceptible de fraudes, adulteraciones o de productos en mal estado, pudiendo llegar a producir intoxicaciones, enfermedades o alergias alimentarias. Esto produce una inseguridad en la población ante la incertidumbre de si el producto que se adquiere es genuino y seguro, además de la vulnerabilidad de los productores de cara a la protección del producto que ofertan. Bien es cierto que existen etiquetas con Denominación de Origen Protegido (D.O.P.) y sus variantes como elemento diferenciador de la calidad, así como normativas europeas <sup>1</sup> en la lucha contra el fraude alimentario, pero se hacen insuficientes ante los numerosos casos de fraudes que benefician el bolsillo de unos y perjudica la salud de muchos otros.

Los consumidores demandan una mayor calidad en el proceso de producción, con un control en la trazabilidad que garantice que el resultado final sea acorde a los estándares exigidos por ley y que las especificaciones del alimento se correspondan con su contenido. Ante este hecho se hace imprescindible una herramienta analítica rápida, precisa y capaz de llevar a cabo un análisis que permita un control de calidad. Este es precisamente el objetivo que se propone en este trabajo, el uso de la tecnología láser unida a herramientas quimiométricas. En concreto, la hipótesis a verificar es que la tecnología láser aplicada a las espectroscopias de fluorescencia y plasma inducido por láser junto con herramientas quimiométricas como las redes neuronales artificiales y los parámetros caóticos, sirven como instrumento evaluador de la calidad y la caracterización de distintos alimentos. Dicha tecnología ha sido validada en una serie de alimentos como la miel, el aceite de oliva virgen extra y el vinagre, donde se realiza un estudio de la “huella dactilar” del producto para posteriormente someterlo a diferentes situaciones que ocurren en la industria, simulando las posibles adulteraciones, condiciones de almacenaje o degradaciones del alimento en la cadena de distribución.

A la hora de realizar la experimentación se hizo una comparativa entre dos tipos de láseres: el primero de ellos correspondiente al láser pulsado (láser Nd:YAG) y el segundo

al continuo (diodo láser). En el caso del láser pulsado se llevó a cabo un análisis de muestras de mieles de diferentes orígenes botánicos. Se hizo un estudio de la caracterización de muestras puras y un análisis de mezclas fraudulentas viendo la capacidad resolutoria de la técnica presentada. En el caso del diodo láser, se llevaron a cabo una serie de experimentos con aceite de oliva virgen extra, vinagre y miel. Con el aceite de oliva virgen se simulaban casos de adulteraciones con otros aceites de peor calidad y distintos recipientes de almacenaje. En el caso del vinagre y la miel se caracterizaron y compararon muestras puras y mezclas viendo la valía de la técnica. Al igual que con el láser pulsado se hizo una comparativa entre muestras puras, degradadas y adulteradas. Validando de esta forma la tecnología presentada en el control de calidad de los alimentos chequeados.

Viendo los resultados obtenidos en los diferentes experimentos planteados, se puede afirmar que la sinergia entre la tecnología láser y las herramientas quimiométricas, dan como resultado una herramienta potente, versátil y de gran alcance en el ámbito del control de calidad de los alimentos. Todo esto unido con la capacidad de integración que tienen estos sistemas en las tecnologías ya implantadas, confiere a este desarrollo unas características muy prometedoras en el ámbito alimentario.

## Summary

### *Induced plasma spectroscopy and molecular fluorescence in food quality control*

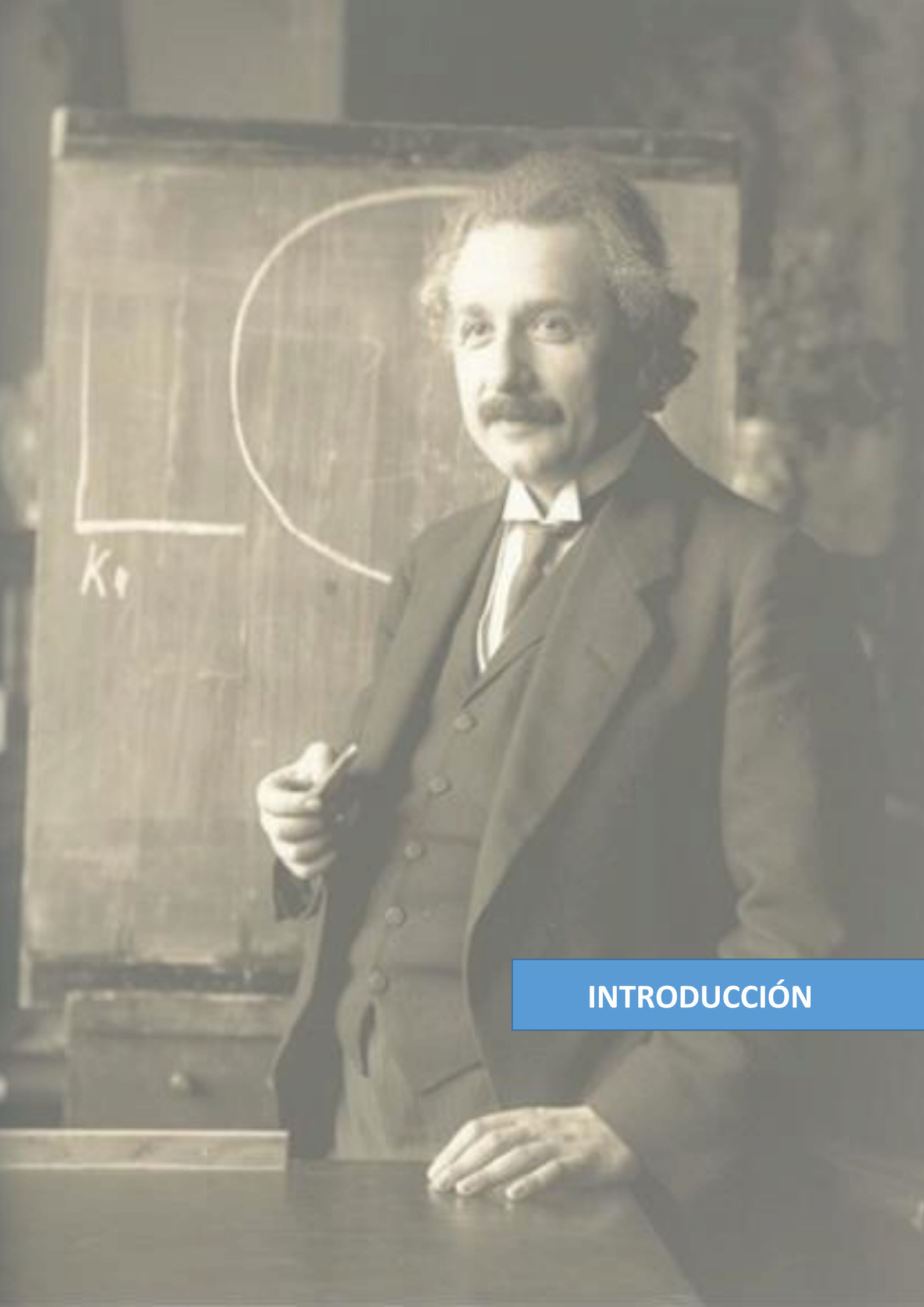
The food industry is a sector in continuous evolution, with a great amount both in imports and exports between countries, being susceptible to frauds, adulterations, or products in poor condition, which can lead to intoxications, diseases, or allergies. This produces insecurity in the population due to the uncertainty of whether the product that is bought is genuine and safe, in addition to the vulnerability of the producers regarding the protection of the product that they offer. It is true that there are labels with Protected Designation of Origin (PDO) and its variants as a differentiating element of quality, as well as European regulations in the fight against food fraud <sup>1</sup>, but they are insufficient against the numerous cases of fraud that economically benefit a few while tricking and harming the health of many others.

Consumers demand higher quality in the production process, with a control in the traceability that guarantees that the final result is in accordance with the standards required by law and that the specifications of the food correspond to its content. Faced with this fact, it is essential to have a fast, precise analytical tool capable of carrying out an analysis that allows for quality control. This is precisely the objective that is proposed in this work, which will be carried out by combining laser technology with chemometric tools. In particular, the hypothesis to be verified is that laser technology applied to fluorescence and laser-induced breakdown spectroscopies in combination with algorithms such as artificial neural networks and chaotic parameters, serve as an instrument to evaluate the quality and characterization of different foods. This technology has been validated in a series of foods such as honey, extra virgin olive oil, and vinegar, where studies and analyses of the "fingerprints" of the products are carried out to subsequently submit them to different conditions and actions that occur in the industry, simulating possible adulterations and/or degradations of the food during the distribution chain.

When carrying out the experimentation, a comparison was made between two types of lasers: the first corresponding to a pulsed laser (Nd:YAG laser) and the second to a continuous one (laser diode). In the case of the pulsed laser, an analysis of samples of

honeys from different botanical origins was carried out. A study was made to characterize pure samples and an analysis of fraudulent mixtures revealing the suitability of the technique. In the case of the laser diode, a series of experiments were carried out with extra virgin olive oil, vinegar, and honey. The extra virgin olive oil was used to simulate cases of adulteration with other oils of poorer quality and different storage containers. In the cases of vinegar and honey, they were characterized and compared, including pure samples and mixtures, demonstrating the value of the proposed approach. As with the pulsed laser, a comparison was made between pure, degraded, and adulterated samples, validating in this way the technology presented for quality control purposes of foods.

Seeing the results obtained in the different experiments proposed, we can affirm that the synergy between laser technology and chemometric tools provide us with a set of powerful and versatile food quality control applications. All this, together with the integration capability that these systems have with the technologies already implemented, provides this development a set of promising characteristics in the food field.



## INTRODUCCIÓN



## 1. Introducción

La alimentación en la humanidad ha sido causante de diversas enfermedades puntuales y crónicas en la sociedad. Es por ello que en la lucha de multitud de enfermedades se prescriben una ingesta de determinados alimentos con una calidad definida. Actualmente, esta situación se sigue produciendo no solo por lo mencionado sino por la gran oferta que el sector alimentario ofrece a la sociedad. Es por lo que, en este escenario, es necesario encontrar herramientas capaces de detectar actividades fraudulentas que lleven consigo la pérdida de la calidad de los alimentos.

### 1.1 Calidad alimentaria

La calidad, según la Real Academia Española (RAE), se define como la *“Adecuación de un producto o servicio a las características especificadas”*. No obstante, el término calidad alimentaria es entendido de muchas maneras, según el enfoque. En el ámbito alimentario, se puede identificar un alimento de calidad como aquel que está libre de todo producto químico y, sin embargo, en la cara opuesta, considerar a un alimento de calidad aquel que se muestra con un aspecto ideal, perfecto y duradero; hecho que conduce al uso de químicos. El uso de estos productos, ha dado la posibilidad de poder producir una gama más amplia de alimentos, con mayor resistencia al deterioro, lo que da la posibilidad de su distribución sin perder apreciablemente sus propiedades.

Un alimento ideal es aquel que presenta una excelente combinación entre calidad nutricional y sensorial<sup>2</sup>. Cada vez hay un mayor porcentaje de la población que relaciona una nutrición adecuada y un estilo de vida saludable, con una disminución de la probabilidad de padecer enfermedades<sup>3</sup>. Asimismo, se está creando una tendencia a consumir productos saludables, bajos en grasas, con antioxidantes, vitaminas, etc. Todo esto provoca que se lleguen a consumir productos que no son originalmente todo lo *“saludables”* que el marketing publicitario<sup>4</sup> sugiere, aunque sí lo parezcan.

En este contexto, el sector y los consumidores solicitan una mayor capacidad de producción y también una calidad en constante aumento. Por ello, el sector alimentario está en continua evolución, buscando nuevos métodos de producción más rápidos y eficaces con respecto a la calidad<sup>5</sup>. La producción de alimentos ha pasado de realizarse de manera artesanal, con casi total desconocimiento de su composición y métodos de

conservación<sup>6</sup>, a una producción con total control sobre el producto<sup>7</sup> y su correcto almacenamiento. Estos requerimientos en su mayor parte están siendo satisfechos por un desarrollo tecnológico en constante evolución. Dicha evolución está llevando en algunos casos a caminos erróneos, que no cumplen la totalidad de los requerimientos en cuanto a cantidad y calidad del producto. Desarrollos que en la mayor parte de las veces prima la mayor producción por encima de obtener una mejor calidad del producto final, dejando de ofrecer una seguridad adecuada.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) trabaja junto con la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) para abordar la seguridad (calidad) de los alimentos desde su producción hasta su posterior consumo<sup>7</sup> (*vide infra*). Este es un factor determinante ya que un déficit de control en el proceso de producción y distribución conduciría a una problemática cada vez mayor en el sector alimentario como pueden ser las basadas en las adulteraciones de productos con otros de menor calidad y precio<sup>8</sup>. Esta práctica es cada vez más frecuente y muchas veces difícil de detectar, lo que pone en entredicho si la seguridad alimentaria es adecuada para el grado de actividades fraudulentas existentes y en aumento. Es por lo que se hace necesario el control de los alimentos para poder garantizar sus parámetros de calidad y seguridad, evitando posibles peligros relacionados con adulteraciones, alergias alimentarias, actividades fraudulentas y/o alimentos en mal estado que afectan notablemente a la salud humana.

Detectar alimentos adulterados no es una tarea sencilla, ya que en la mayoría de los casos el adulterante utilizado presenta características muy similares al producto adulterado, haciendo en algunas ocasiones imposible su localización. Los métodos más tradicionales de medida (pH, humedad, índice de refracción, etc.) se hacen insuficientes por la falta de capacidad para detectar la presencia/ausencia de adulterante. Actualmente, existen numerosas técnicas analíticas capaces de identificar dichos adulterantes<sup>9,10</sup>. Entre las diferentes técnicas podemos destacar: espectroscopia inducida por láser<sup>11</sup>, espectroscopia de Raman<sup>12</sup>, voltamperometría<sup>13</sup> o mediante absorción en UV-VIS, que mediante herramientas quimiométricas, se puede llegar a potenciar la técnica analítica<sup>14</sup>. También hay que tener presente las detecciones de componentes o microorganismos en concentraciones que sean nocivas para la salud del individuo, como pueden ser, entre otros, metales, pesticidas o bacterias.

### 1.1.1 Seguridad alimentaria

La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación define la seguridad alimentaria como: *“La seguridad alimentaria existe cuando todas las personas tienen acceso en todo momento (ya sea físico, social, y económico) a alimentos suficientes, seguros y nutritivos para cubrir sus necesidades nutricionales y las preferencias culturales para una vida sana y activa.”*<sup>15</sup>.

Cuando se habla de seguridad alimentaria, se refiere a la inocuidad alimentaria, a los procesos llevados a cabo para preservar los alimentos de posibles contaminaciones, degradación y/o malas prácticas. Son numerosos los factores que pueden afectar a la calidad de un alimento, ya sean de tipo físico, químico o biológico. Es por ello de vital importancia llevar un estricto control en todo el proceso de producción y de distribución de los alimentos, empezando por la producción de cultivos y la calidad nutricional de los productos alimenticios<sup>16</sup>.

En los últimos años, han aparecido numerosos escándalos relacionados con la alimentación, como la intoxicación por Hg en Minamata<sup>17</sup>, la intoxicación con aceite de colza<sup>18</sup> o la enfermedad de las vacas locas<sup>19</sup>. Todo esto está llevando a la desconfianza del consumidor ante la incertidumbre de si hay o no un estricto control para garantizar los estándares de calidad dictaminados por la reglamentación vigente<sup>20</sup>. Además del problema de las posibles enfermedades originadas por los alimentos, también nos encontramos con los problemas originados por las alergias alimentarias<sup>21</sup>, que pueden llevar a un posible riesgo de salud o incluso vital. Debido a la competencia feroz presente en el sector alimentario, más que apostar por la calidad como parámetro diferenciador, se han llevado a cabo técnicas fraudulentas para sacar mayor rendimiento económico en algunos alimentos, originando riesgos claros para la salud<sup>22</sup>. Esto crea la necesidad de un sistema que permita una identificación y control de los alimentos que no cumplen la reglamentación vigente, para así dar una garantía de que los alimentos que se consumen responden a la calidad publicitada, requerida y adquirida.

El avance en el campo de la calidad alimentaria es cada día mayor. Se pueden encontrar estudios recientes en los que hacen uso de biosensores (basados en células) para la detección de toxinas o alérgenos presentes en el alimento<sup>23</sup>, la aplicación de la

espectroscopia de diodo láser para detectar el contenido de oxígeno en los envases (ya que dicho gas afecta a la calidad, deteriorando el producto)<sup>24</sup>, la evaluación de la calidad mediante espectroscopia Raman<sup>25</sup>, el uso de la espectroscopia UV-vis para monitorear la calidad de un alimento<sup>26</sup> o técnicas fluorescentes basadas en la emisión de LEDs (“*light emitting diodes*”) para control de calidad en mieles<sup>27</sup>. Semejantes a estas, son destacables algunas técnicas basadas en láser, las cuales vienen a satisfacer estos requerimientos en el sector alimentario. En concreto, cabría destacar aquellos equipos cuyas fuentes están basadas en láseres continuos como el diodo láser<sup>28</sup> y también en láseres pulsados donde la energía es notablemente superior al anterior<sup>29,30,31</sup> (*vide infra*).

### 1.1.2 Adulteración alimentaria

La adulteración de los alimentos es una problemática que nos lleva acompañando desde tiempos antiguos, donde se vendían productos con características diferentes a lo que se marcaba, es decir, nos vendían “gato por liebre”. Se considera un alimento adulterado cuando se altera o elimina parte de la composición, añadiendo o quitando de manera intencionada, alguna sustancia (por otras de menor calidad) con fines fraudulentos. La problemática que genera este tipo de actos radica en la desconfianza por parte del consumidor sobre la autenticidad del producto. Es por ello, que los mismos productos ecológicos o incluso los productos con denominación de origen protegida también quedan en entredicho por estas actividades de adulteración y actividades fraudulentas tanto en la producción como en la distribución, en la mayor parte de las ocasiones. A pesar del conocimiento de este tipo de actividades y del enorme desarrollo tecnológico que hay, la adulteración alimentaria se sigue practicando, intentando burlar los controles más estrictos de la reglamentación vigente. Todo ello movido por los grandes beneficios económicos que aportan estas actividades, aún siendo a costa del bolsillo del consumidor y en numerosas ocasiones de su salud<sup>32</sup>, convirtiéndose en un problema de seguridad alimentaria. Cuando se produce el incumplimiento de manera deliberada de las normas alimentarias con fines monetarios, estamos hablando de fraude alimentario. Este fraude alimentario se podría clasificar en dos categorías:

- **Referidos a los ingredientes que contiene el alimento**, donde se adiciona, sustituye o altera algún ingrediente.

- **Referidos al etiquetado**, donde la información reflejada no concuerda con el contenido.

La no declaración de algún ingrediente en el etiquetado puede provocar reacciones adversas y graves a determinados consumidores, como les podrían ocurrir a las personas alérgicas a estos ingredientes. En esta línea, el conocimiento de la trazabilidad del producto es una buena herramienta en la lucha contra el fraude alimentario, asegurando la calidad del producto y la salud del consumidor. En nuestro país existe la Ley 28/2015 de 30 de julio, que lucha contra el fraude alimentario y en pro de la protección de la calidad alimentaria<sup>33</sup>, mientras que a nivel europeo tenemos el Reglamento (UE) nº 1151/2012 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 21 de noviembre de 2012.

Según el informe anual de 2017 publicado por la Comisión Europea, España es el país que más sospechas ha tenido en cuanto a fraude alimentario. Los productos con más riesgo de fraude alimentario son, según un informe presentado por la Comisión de Medio Ambiente, Salud Pública y Seguridad Alimentaria del Parlamento Europeo: aceite de oliva, pescado, alimentos ecológicos, leche, cereales, miel, café, azafrán, vino y determinados zumos<sup>34,35</sup>. Estos productos tienen una elevada demanda, lo que los hace susceptibles de ser adulterados con otros productos de menor calidad, adición de sustancias no declaradas en el envase o utilización de químicos entre otros.

En este contexto, es indispensable desarrollar herramientas sencillas y precisas para la detección de este tipo de adulteraciones. Como se comentó, el láser como fuente de radiación ofrece resultados sobresalientes en la determinación de la composición de mezclas<sup>28</sup> y en otros campos directamente relacionados<sup>36</sup>.

### 1.1.3 Etiquetado y Denominación de Origen Protegido

El etiquetado de un alimento es la principal vía de comunicación entre productores y consumidores. Gracias al mismo, se conoce el contenido, origen y caducidad de un producto. Proporciona la información necesaria para que el consumidor pueda tomar la decisión de comprarla en base a la información nutricional o a posibles alergias alimentarias, además de servir como identificativo del cumplimiento de las leyes o normas reguladoras establecidas. Existen normativas reguladoras<sup>37</sup> que regulan la información mostrada al consumidor, en protección de la salud. Además de las normas referidas al contenido, existen otro tipo de etiquetas regularizadas<sup>1</sup>, que establece las definiciones de Denominación de Origen Protegida (DOP) y de Indicación Geográfica Protegida (IGP). Estas denominaciones han sido utilizadas como herramienta protectora para relacionar la calidad y características de un producto con el medio geográfico donde se lleva a cabo su producción. Son numerosos los alimentos que presentan etiquetas con denominación de origen, como se puede observar en la **tabla 1**.

**Tabla 1.** Basada en el informe del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación del año 2017 sobre DOP e IGP en alimentos españoles<sup>38</sup>.

Producto	Número de denominaciones
Vino	95
Aceite de oliva virgen	29
Frutas	24
Miel	7
Pescados y moluscos	5
Vinagres	3
Arroz	3

La gran profusión de este tipo de calificaciones y las alteraciones que ocurren entre productos con DOP o IGP de los que no lo son, llevan al planteamiento de si hay un aporte real en cuanto a ser un elemento diferenciador de la calidad de un producto.

La problemática que ha adquirido el etiquetado en cuanto a la falsedad de la información reflejada ha hecho necesario el uso de análisis químicos precisos que garanticen la autenticidad de este. Al igual que avanza la tecnología del análisis químico de alimentos,

evoluciona la de los fraudes, llevando a una mayor complejidad de detección. Por esta razón, la quimiometría ha adquirido una gran importancia como una herramienta potenciadora de la química analítica.

#### **1.1.4 Química Analítica y quimiometría**

La química analítica es una rama de la ciencia dedicada al estudio de la caracterización química de los materiales naturales o artificiales. Tiene un papel importante en campos como la química forense, química metalúrgica, farmacéutica o agrícola. El análisis de muestras se hace en base al conocimiento de las diferentes sustancias presentes en el material y las cantidades relativas en el mismo, es decir, se establece un análisis tanto cualitativo como cuantitativo. Con el análisis cualitativo, se puede por ejemplo determinar la presencia o ausencia de un adulterante en un alimento, mientras que con el análisis cuantitativo se define su proporción. Con todo esto se puede decir que la química analítica comprende la separación, identificación y determinación de las cantidades relativas de los componentes de una muestra<sup>39</sup>.

Cuando juntamos la química analítica y los métodos matemáticos, estadísticos y de lógica formal a la hora de analizar datos químicos, nos encontramos con una potente herramienta denominada quimiometría. La quimiometría trata aquellos procesos que transforman señales analíticas y datos en información útil de la muestra. Aplica las técnicas matemáticas de la estadística a los problemas analíticos de la identificación y cuantificación de las sustancias químicas, siendo habitual el uso de la quimiometría en la mayor parte de los análisis químicos<sup>40</sup>. Es una disciplina ampliamente usada por el gran aporte que proporciona al poder tratar la gran cantidad de información facilitada por los equipos instrumentales actuales.

Los distintos alimentos analizados en esta tesis se estudiaron mediante las técnicas espectroscópicas de fluorescencia molecular y de emisión atómica usando para ello el láser continuo y pulsado.

## 1.2 Radiación láser

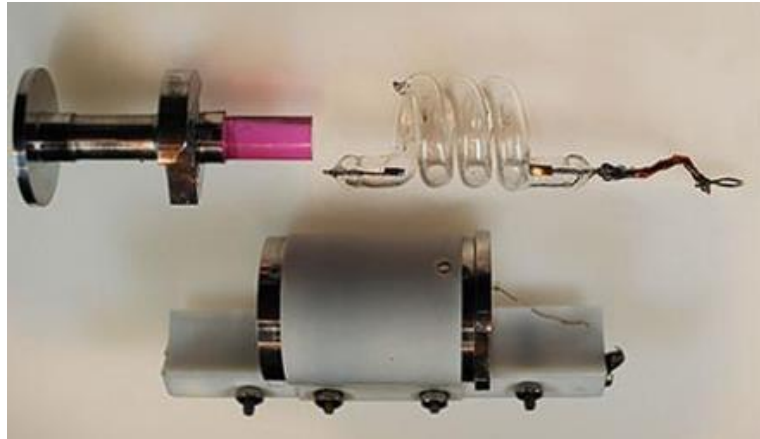
El láser es una fuente de luz que está siendo utilizada en múltiples aplicaciones en el ámbito de la salud, alimentación, industria, entre otras. En este apartado se describirá en más detalle no solo las principales características, sino, además, la historia de este instrumento y el tipo de radiación que produce que le ha hecho insustituible en algunas aplicaciones.

### 1.2.1 Historia del láser y sus aplicaciones

Durante los primeros años del siglo XX, concretamente en 1917, Albert Einstein introduce el concepto de “emisión estimulada”, que junto con diferentes técnicas como el bombeo óptico y los máseres (amplificadores de microondas por emisión estimulada de radiación<sup>41</sup>), dieron lugar al desarrollo de los láseres<sup>42</sup>. Todo esto se llevó a cabo utilizando la ley de radiación de Max Planck; en concreto conceptos basados en la emisión espontánea<sup>43</sup> y estimulada<sup>44</sup> de la radiación. Según postuló Planck, la energía que transporta una radiación electromagnética lo hacía en forma de cuantos de energía, también llamados fotones. Los electrones contenidos en un átomo no pueden ocupar cualquier nivel energético con lo que solo absorben o emiten determinados valores de energía cuantizados. La energía que transporta una radiación es directamente proporcional a la frecuencia y puede calcularse mediante la ecuación de Planck (**ecuación 1**), donde  $h$  es la constante de Planck,  $\nu$  la frecuencia y  $E$  es la energía.

$$E = h \cdot \nu \quad (1)$$

En 1953, se llevó a cabo la construcción del máser por Charles Townes y Leonard Schawlow, con el que se demostró la viabilidad del principio de emisión estimulada. Pocos años después (1960), Theodore Maiman construyó el primer prototipo de trabajo de un láser que operaba a frecuencias ópticas<sup>45</sup> por medio de un cristal de rubí, **figura 1**<sup>46</sup>. Estos láseres, constituidos por un cristal de  $\text{Al}_2\text{O}_3$  dopado con iones  $\text{Cr}^{3+}$  (rubí), producían un haz coherente de microondas, pero eran incapaces de funcionar en continuo<sup>47</sup>.



**Figura 1.** Componentes del láser de rubí construido en 1960.

Un año más tarde, William Bennet y Ali Javan, de los Laboratorios Bell, fabrican un láser capaz de emitir en continuo y no de manera pulsada (como el láser de rubí) gracias al láser de gas de helio-neón<sup>48</sup>, **figura 2**.



**Figura 2.** William Bennet y Ali Javan, creadores del láser de He-Ne.

En 1959, Gordon Gould y TRG (*Technical Research Group*) solicitan las primeras patentes láser con aplicaciones prácticas como medidores de distancia. Townes ya había solicitado un año antes su patente láser, concedida en 1960. Gould interpuso una demanda alegando que el descubrimiento fue suyo y que la idea había sido robada. Esta lucha de patentes se alargó durante 30 años<sup>49</sup>, la cual finalmente fue ganada por Gould.

En 1962 se consiguieron emisiones láser en uniones p-n en Galio-Arsénico (diodo láser)<sup>50</sup>. R.W. Hellwarth y F.J. McClung demuestran la técnica de Q-switching<sup>51</sup>; dicha técnica

permite a un láser producir un haz pulsado de elevada energía usando un láser de rubí, consiguiendo los primeros pulsos láser de nanosegundo. Un año después, en 1963, L.E. Hargrove, Richard, L. Fork, y M.A. Pollack demuestran por primera vez la técnica de mode-locking<sup>52,53</sup>, la cual permite a un láser He-Ne y modulador acusto-óptico, alcanzar pulsos ultracortos de picosegundos y femtosegundos. En estas fechas, Patel y col.<sup>54</sup> desarrollan el láser de anhídrido carbónico (CO<sub>2</sub>). Este láser de CO<sub>2</sub> presenta una mayor eficiencia a un coste mucho menor que en el caso del láser de rubí, por lo que se sigue usando en la actualidad<sup>55</sup>.

La primera aplicación comercial de los láseres fue la del procesamiento de materiales. Esta aplicación se desarrolló en mayo de 1967, cuando Peter Houldcroft usó un haz láser CO<sub>2</sub><sup>56</sup> asistido por oxígeno para cortar una lámina de acero de 1 mm de espesor, **figura 3**.



**Figura 3.** Láser de CO<sub>2</sub> cortando placa una placa metálica <sup>57</sup>.

Ya en la década de los años 80, se registran las primeras emisiones láseres en el rango de los Rayos X<sup>58</sup>. Años más tarde, se hace el uso de la tecnología láser para la grabación y lectura de datos, nos estamos refiriendo al CD, que evolucionó en DVD y Blu-Ray aumentando en la capacidad y calidad de los datos almacenados. Este tipo de sistemas de almacenamiento eran leídos mediante láseres de baja potencia. Son con estos avances cuando el láser comienza a instalarse de forma efectiva e importante en la vida cotidiana<sup>59</sup>.

En 1997, Steven Chu, Claude Cohen-Tannoudji y William D. Phillips reciben el Premio Nobel en Física por sus estudios en los métodos de enfriamiento y atrapamiento de átomos con

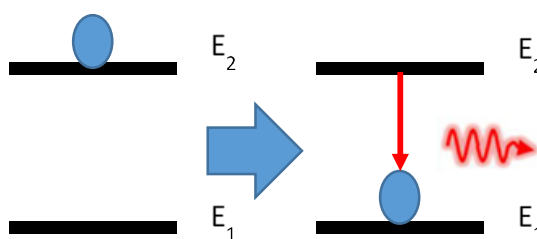
luz láser<sup>60</sup>. Dos años más tarde, Ahmed H. Zewail recibe el Premio Nobel en Química por sus estudios de la transición entre estados que tiene lugar durante las reacciones químicas mediante espectroscopia láser ultrarrápida. Ya en el siglo XXI, los avances en los láseres no dejan de suceder; nos encontramos con estudios sobre láseres de semiconductores<sup>61,62</sup> aplicados en la medicina e investigación donde un bajo coste no está reñido con un desarrollo efectivo.

Hoy en día, el uso del láser se sigue extendiendo de manera exponencial. Nos encontramos ante una enorme variedad de láseres, que cubren las necesidades tanto del día a día (lector de cd) como las que requieren tecnologías más punteras aplicadas en la investigación (láseres pulsados) o industria (láser de CO<sub>2</sub>).

### 1.2.2 Definición de láser

La palabra láser proviene de un acrónimo inglés extraído de “*Light Amplified by Stimulated Emission of Radiation*” (luz amplificada por emisión estimulada de radiación); es básicamente una fuente de luz. Lo que diferencia a un láser de otras fuentes de luz, es el mecanismo físico por el que se produce la emisión de luz, que se basa en la emisión estimulada<sup>63</sup> en contra de la emisión espontánea, que es la responsable de la mayor parte de la luz, **figura 4**. Las diferencias entre la emisión espontánea y estimulada son<sup>64</sup>:

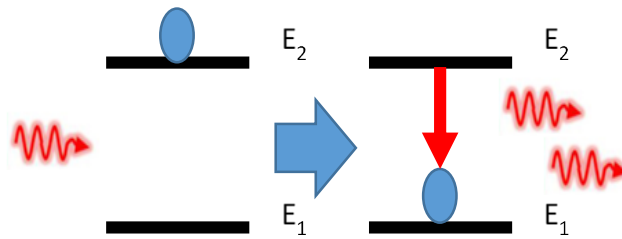
- Emisión espontánea: proceso por el cual un electrón, que se encuentra en el nivel excitado  $E_2$ , decae a un nivel de energía menor de manera espontánea, liberando energía en forma de fotón.



**Figura 4.** Proceso de emisión espontánea.

- Emisión estimulada: cuando un electrón se encuentra en un estado excitado y es incidido por un fotón con una energía equivalente a la diferencia de energías entre el nivel fundamental ( $E_1$ ) y excitado ( $E_2$ ), se provoca la transición del electrón a un nivel

inferior, produciendo un segundo fotón con la misma energía que el incidente, **figura 5**. Esta es la base fundamental de la radiación láser.

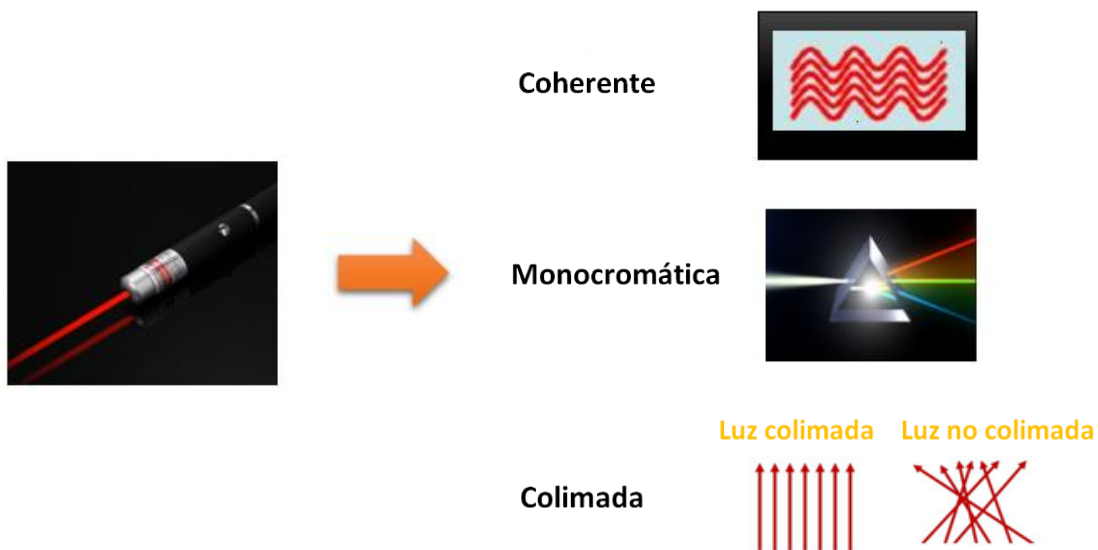


**Figura 5.** Proceso de emisión estimulada.

Teniendo en cuenta estas características de emisión de luz estimulada, o lo que se entiende por láser, es interesante mencionar las principales características físicas que le confieren a esta radiación una situación de privilegio en muchas aplicaciones industriales, comerciales y en el campo de la tecnología e investigación.

### 1.2.3 Características físicas de la emisión láser

La radiación láser a diferencia de la luz convencional, basada en la emisión espontánea, como la procedente de una bombilla, presenta distintas características mostradas de forma general en la **figura 6**. En el caso de la luz convencional, la radiación emitida es heterocromática (al tener distintas longitudes de onda de emisión), no coherente (al no estar en fase temporal ni espacial) y es una radiación no colimada (totalmente desordenada y propagada en todas direcciones).



**Figura 6.** Propiedades de la luz láser.

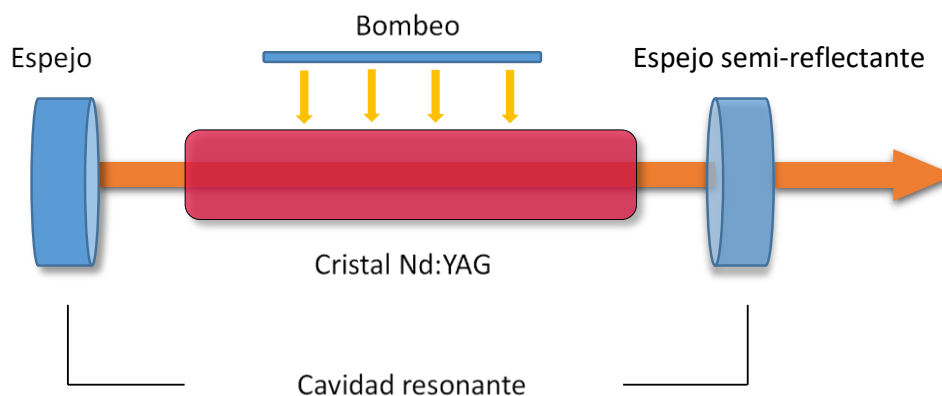
Por el contrario, la radiación láser, basada en una emisión estimulada, se caracteriza por ser poseedora de: (i) fotones que se encuentran en fase, tanto temporal como espacial (coherente); (ii) fotones que tienen una longitud de onda única y específica (monocromática); (iii) radiación emitida en una sola dirección, con escasa divergencia (colimada). A continuación, se exponen en detalle cada una de las características de la luz láser mencionadas<sup>65</sup>:

- a) **Coherencia**<sup>64</sup>. Es la propiedad más importante de los láseres y se produce porque todos los fotones se encuentran en fase (resultado de la emisión estimulada), tanto temporal como espacial. Para permanecer en fase se requiere que todos los fotones emitidos estén exactamente a la misma longitud de onda. Si algunos fotones están en una longitud de onda diferente, la fase de esos fotones en relación con otros será diferente y la luz no será coherente. Al coincidir en una misma dirección de propagación, los estados vibracionales se suman. El resultado es un efecto de amplificación en la intensidad luminosa emitida, característica de la radiación láser.
- b) **Monocromaticidad**<sup>42,66</sup>. Aunque no sea posible llegar a una luz perfectamente monocromática, los láseres emiten en un intervalo muy estrecho de longitudes de onda, considerándose cuasi monocromáticos. Se trata de una propiedad derivada directamente de la emisión estimulada que presenta fotones con la misma longitud de onda. Es un requisito para la coherencia ya que los fotones de longitudes de onda variables no pueden ser coherentes (estar en fase).
- c) **Colimada**<sup>64</sup>. La colimación es la propiedad de la luz láser que le permite permanecer como un haz estrecho y confinado, incluso viajando grandes distancias. La salida altamente direccional de la luz láser radica en el mecanismo propio del láser. La principal utilidad práctica de la radiación láser reside fundamentalmente en que concentra un gran número de fotones y con ello una gran cantidad de energía por unidad de superficie.

Estas principales propiedades mencionadas de la radiación laser, son el resultado de la combinación de diversos componentes, los cuales serán mencionados y descritos a continuación.

### 1.2.4 Componentes de un láser

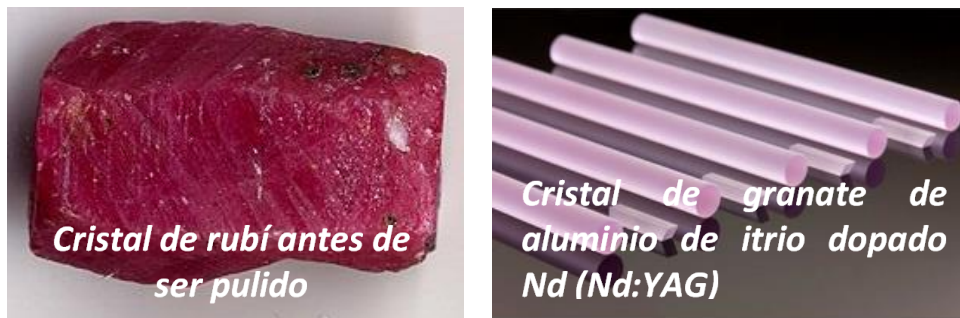
Un sistema de emisión láser debe estar compuesto fundamentalmente por tres partes: un medio activo, un sistema de bombeo y una cavidad óptica resonante<sup>67</sup>, **figura 7**. Para que el láser emita luz, el medio activo debe ser excitado por el sistema de bombeo, del mismo modo que el filamento de una bombilla necesita una corriente eléctrica que pase por él. El sistema de bombeo debe aportar la energía necesaria para producir la excitación de los átomos. Dependiendo del tipo de láser, el sistema de bombeo puede consistir en otro láser, una lámpara convencional, una corriente o descarga eléctrica. Por último, la cavidad óptica resonante, constituida por dos espejos reflectantes paralelos entre los que la luz rebota y ayuda a su amplificación, consigue que un gran flujo de fotones vaya en la misma dirección. Se debe tener en cuenta que uno de los espejos de la cavidad óptica resonante, parcialmente reflectante, permite la emisión de un haz de radiación con escasa divergencia. Dada la importancia de las tres partes en el funcionamiento de un láser, se presenta un detallado resumen de ellas.



**Figura 7.** Interior láser Nd:YAG, donde podemos observar el medio activo (cristal de Nd:YAG) y el sistema de bombeo, compuesto por una lámpara flash de Xe.

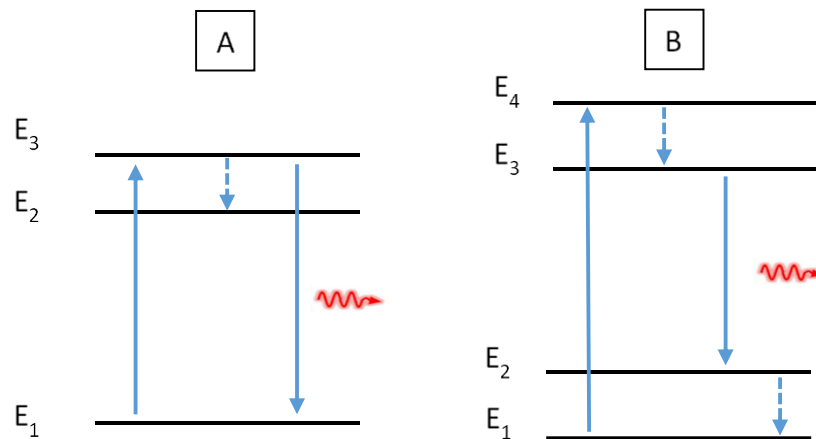
- **.El medio activo** es la parte del láser formado por el material que emite la luz, **figura 8**. Este material, debidamente bombeado, debe posibilitar la inversión de su población (*vide infra*)<sup>68</sup> y la posterior emisión estimulada de la radiación. Para que esto sea posible, es indispensable que una radiación, cuya frecuencia esté en resonancia con la correspondiente a la transición entre dos niveles del medio activo, incida en él. El resultado es la emisión estimulada de una serie de fotones, todos de idéntica frecuencia, que a su vez provocarán más emisión de radiación, de forma que se origina una intensificación de la radiación. Las ondas resultantes de estas transiciones

inducidas poseen idéntica frecuencia, fase, dirección de propagación y estado de polarización que la radiación inicial que provocó dichas transiciones.



**Figura 8.** Ejemplos de medios activos sólidos.

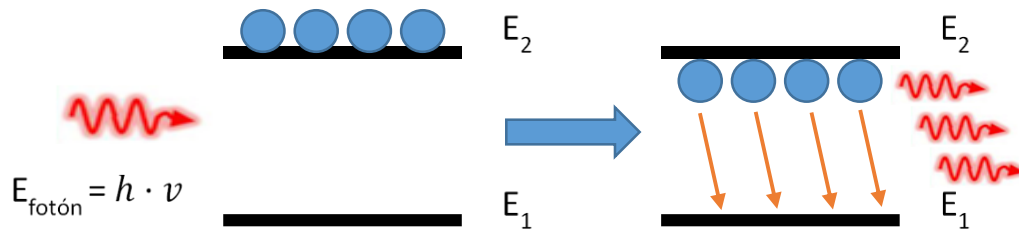
La emisión láser es posible cuando en el material del medio activo se implican sólo dos niveles energéticos, uno estable y otro de excitación, aunque es frecuente que se utilicen materiales con un nivel metaestable, al que los electrones llegan por emisión espontánea desde el nivel de excitación, y desde el cual se producirá la emisión estimulada. Algunos emisores láser implican cuatro o más niveles energéticos, **figura 9.**



**Figura 9.** Sistemas láser de tres (A) y cuatro niveles (B).

Desde la construcción del primer láser de rubí, se ha desarrollado un gran número de sistemas láser utilizando medios sólidos, incluidos los semiconductores, líquidos y gaseosos. El material que constituye el medio activo es, básicamente, el elemento que determina la longitud de onda de la emisión. Se debe de tener presente que, para obtener un proceso de emisión láser, es necesario alcanzar las condiciones umbrales de funcionamiento que permitan la reacción en cadena de fotones estimulados. Debe

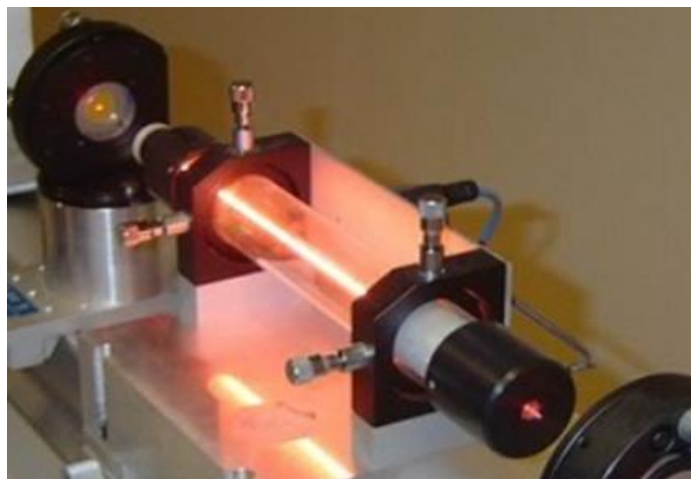
conseguirse que haya mayor número de electrones en el nivel energético de excitación ( $E_2$ ) que en el nivel de energía estable ( $E_1$ ) (inversión de población, **figura 10**).



**Figura 10.** Esquema de emisión estimulada con inversión de población.

Cuando la inversión de población<sup>69</sup> ha producido la caída espontánea de una serie de electrones al nivel estable, origina los fotones con la frecuencia adecuada para iniciar la reacción en cadena de emisión estimulada en un medio que siempre mantiene un nivel de población invertida (gracias al sistema de bombeo) y en el que constantemente hay fotones de idéntica frecuencia pasando a su través, manteniendo la emisión estimulada hasta que cese el bombeo energético.

- **Sistema de bombeo.** Es empleado para excitar electrones desde el nivel fundamental al excitado. Aporta la energía necesaria para aumentar el número de átomos excitados y poder así, garantizar la inversión de población; requisito indispensable para la emisión láser. De forma simplificada, pueden clasificarse en:
  - **Bombeo óptico:** el medio activo es excitado mediante el empleo de una fuente luminosa, del tipo de lámpara de flash de xenón (**figura 11**) u otro láser.



**Figura 11.** Lámpara de flash de xenón

- **Bombeo eléctrico:** este sistema de bombeo se basa en hacer pasar una corriente eléctrica a través del medio activo, habitualmente un gas (láser de He-Ne, **figura 12**) o a través de la unión p-n de un semiconductor (láser de As-Ga).



**Figura 12.** Láser de gas He-Ne.

- **Bombeo químico:** en este sistema, la energía de bombeo para excitar los átomos proviene de la creación y ruptura de enlaces químicos (láser de flúor-hidrógeno).
- **Cavidad óptica resonante.** Constituida por dos espejos paralelos, situados uno en cada extremo del material activo. Cuando la lámpara de bombeo excita el medio activo se emite una radiación a lo largo del eje del láser. Dicha radiación es reflejada por ambos espejos (uno de ellos semi-reflectante). Con esto, lo que se consigue es un gran flujo de fotones que al reflejarse viajen sucesivas veces por el medio activo, amplificando el número de fotones emitidos a cada paso. La oscilación se mantiene ida y vuelta, hasta que las pérdidas son inferiores a las ganancias. La cavidad óptica resonante permite alcanzar tres objetivos esenciales:
  - Aprovechar al máximo la inversión de población.
  - Realizar la amplificación en una única dirección.
  - Lograr la predominante monocromaticidad de la emisión.

A la vista de todas estas características es lógico pensar que existirán una gran variedad de tipos de láser y que estos, mediante las características requeridas, pueden ser seleccionados y empleados con distintos fines y objetivos.

### 1.2.5 Tipos de láser

Nos encontramos con una gran variedad y diversidad de láseres, tales como los pulsados, continuos, más o menos energéticos..., que se diferencian fundamentalmente en el medio activo donde se genera la emisión. Podemos distinguir cuatro grupos principales:

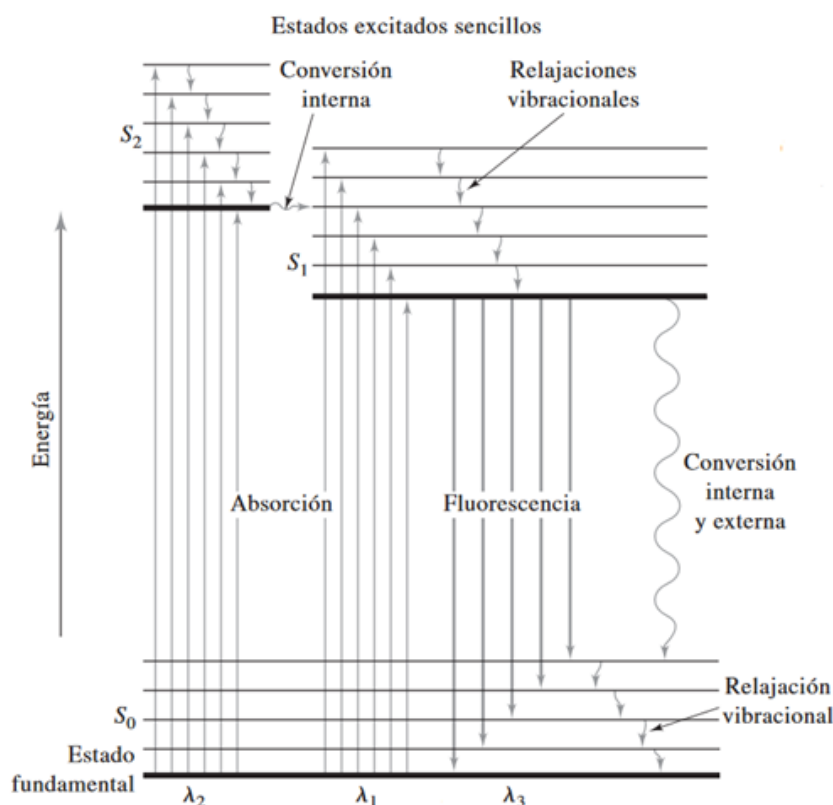
- **Láser de estado sólido:** caracterizado por tener como medio activo un sólido (vidrio o cristal<sup>70</sup>) ligeramente impurificado. Dicha impurificación proporciona la estructura energética necesaria para producir el efecto láser. Dentro de esta categoría se encuentran los láseres de Neodimio-YAG (granate de itrio y aluminio dopado con impurezas de neodimio), titanio-zafiro o el láser de rubí.
- **Láser de semiconductor:** en este caso, el medio activo consiste en una unión semiconductor tipo LED (del inglés "light emitting diode") alojada dentro de una cavidad reflectora que permite la oscilación láser. Existen además otros tipos con un funcionamiento diferente, como pueden ser los puntos cuánticos<sup>71</sup> o láseres de cascada cuántica<sup>72</sup>. El láser de punto cuántico es un tipo de láser semiconductor que usa puntos cuánticos (nano cristales semiconductores, confinados en las tres direcciones del espacio debido a la restricción de movimiento) como medio activo. Controlando el tamaño de los nano-cristales, se controla el color de emisión, es decir, la separación entre niveles de energía. En los láseres de cascada cuántica, las transiciones se producen de manera periódica a lo largo de la estructura del láser, creando cuantos energéticos en cada salto, formando una "cascada energética".
- **Láser de gas:** estos láseres tienen uno o varios gases como medio activo confinados dentro de un tubo de vidrio<sup>73</sup>. Habitualmente emiten a una longitud de onda de 633 nm, es decir, luz visible de color rojo. Dentro de esta categoría se encuentran los láseres de helio-neón o argón.
- **Láser de colorante:** es un tipo de láser que utiliza como medio activo un colorante orgánico. Generalmente es un medio líquido que circula a través de la cavidad<sup>74</sup>. El láser de colorante, a diferencia del láser de gas, utiliza una gama más amplia de longitudes de onda sobre un ancho espectro, que puede ir desde el ultravioleta (UV) cercano al infrarrojo (IR) cercano.

Toda esta tecnología se ha centrado en el desarrollo de diversos tipos de láseres más adecuados para campos de aplicación. Entre ellos se mostrarán algunos láseres que han

manifestado unas características adecuadas en el campo analítico y control de calidad. Si analizamos los equipos espectroscópicos desde el punto de vista del uso de una fuente láser, se llega a los equipos basados en la fluorescencia.

### 1.2.6 Fluorescencia

Es un fenómeno que ocurre cuando algunas moléculas son capaces de excitarse mediante la absorción de fotones, para luego emitir en forma de radiación electromagnética a longitudes de onda mayores y de menor energía que las de la radiación incidente<sup>75</sup>. Este proceso transcurre en tiempos muy cortos, menores de  $10^{-5}$  segundos, por lo que el fenómeno se prolonga durante el tiempo que dure el estímulo; al cesar el estímulo, también cesa la fluorescencia. Para que la fluorescencia tenga lugar, las moléculas a analizar deben contener ciertas regiones llamadas fluoróforos, que no son más que aquellas responsables de la emisión fluorescente. Mediante el diagrama de Jablonski (figura 13), se explica el fenómeno de la fluorescencia.



**Figura 13.** Diagrama parcial de energía para un sistema fotoluminiscente (Diagrama de Jablonski)<sup>76</sup>.

El diagrama de Jablonski permite visualizar los procesos de una molécula asociados a su irradiación con luz: absorción fotónica y excitación del estado fundamental ( $S_0$ ) a un nivel

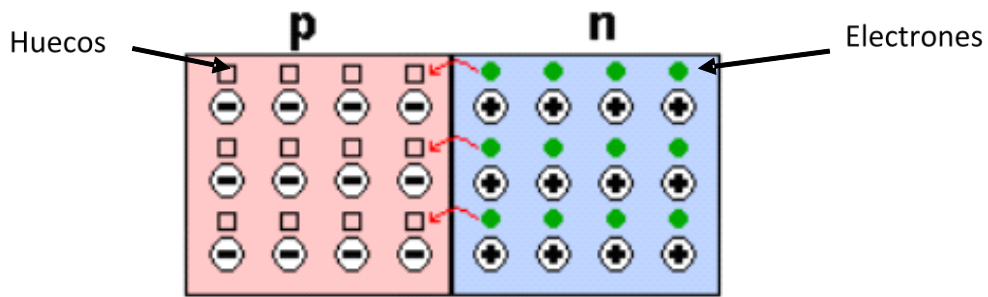
energético electrónico, vibracional o rotacional superior ( $S^*$ ), y recuperación del estado fundamental a través del estado electrónico singlete ( $S_1$ ), con emisión de fluorescencia. La fluorescencia se produce cuando la sustancia objeto de estudio, es irradiada mediante una fuente de excitación. Eso se consigue gracias entre otros, al laser continuo (diodo láser).

La espectroscopia de fluorescencia es un método utilizado en investigación aplicado en campos como la química, biomedicina o en bioquímica, usado para mediciones analíticas como la caracterización de alimentos<sup>77</sup> o como herramienta de análisis medio ambiental<sup>78</sup> debido a su extrema sensibilidad y especificidad. En algunos casos ofrece dificultad en el análisis cuantitativo, provocado por el efecto de filtro interno donde la intensidad fluorescente no es proporcional a la concentración del fluoróforo. El efecto de filtro interno consiste en la reabsorción, por una o más moléculas, de una parte o la totalidad de la radiación emitida por un fluoróforo<sup>79</sup>. Por todo esto, debe ser considerado al analizar los espectros fluorescentes.

### 1.2.6.1 Láser continuo

Como se ha descrito anteriormente, el diodo láser es un dispositivo semiconductor que, bajo las condiciones de alimentación adecuadas, produce y emite luz láser. Los semiconductores más conocidos y utilizados están basados en germanio y silicio, aunque también al combinar arsénico y galio obtenemos un cristal con características similares.

Cuando se combinan dos semiconductores, uno de ellos con exceso de electrones en la banda de valencia (tipo n), y el otro con defecto de electrones, o lo que es lo mismo, exceso de huecos (tipo p), se genera una unión p-n, **figura 14**. El exceso de electrones o de huecos en el cristal se consigue añadiendo impurezas al mismo. En concreto, se añadiría Te al cristal para crear exceso de electrones o Zn para crear exceso de huecos. Con el paso de la corriente eléctrica, los electrones alojados en la región tipo n se mueven hacia la región tipo p, generando nuevos huecos al migrar. En el mismo instante que ocurre esa combinación, la energía en exceso que adquirió dicho electrón para poder atravesar la barrera de potencial, se transforma en energía electromagnética, que libera, en ese preciso momento, en forma de fotón de luz<sup>80,81</sup>.



**Figura 14.** Unión p-n en semiconductores.

Cuando la corriente suministrada al diodo es baja, el número de electrones y huecos es pequeño y la ganancia en el dispositivo es insuficiente como para poder superar la condición umbral de energía de fotón. Por el contrario, cuando se supera el umbral de energía se produce el mecanismo de inversión de población y se produce una emisión estimulada. Si no se llegase a alcanzar la condición de umbral, la emisión que presentaría no sería coherente, y estaríamos ante un diodo led <sup>42</sup>.

Entre las principales características que muestran los diodos láser cabría destacar aspectos relacionados con el tamaño, portabilidad, consumo, etc. Dada la importancia de estas propiedades, se abordan en mayor detalle:

- **Dimensiones y peso:** Las dimensiones comunes de estos diodos son cilíndricos de 5 cm de altura y 0.5 cm de radio. Asimismo, el peso pequeño, de unos pocos gramos (100 aproximadamente), lo que les confiere una amplia manejabilidad.
- **Voltajes, amperajes y requisitos energéticos:** la mayoría de los diodos láser consumen de 1 a 5 mW de potencia y se activan con un voltaje constante de entre 3 a 12 voltios, por lo que pueden funcionar con fuentes pequeñas de energía (umbral de corriente relativamente bajo).
- **Intensidad reducida:** un diodo láser no se puede utilizar para grandes requerimientos energéticos, tales como realizar perforaciones en el metal o realizar el taladrado en alguna superficie dura, pero lo que los hace atractivos son su salida coherente, que resulta de alta eficiencia, además de su facilidad de modulación. Estas propiedades los hacen bastante útiles en sistemas de telecomunicaciones vía fibra óptica y/o en la realización de cuantificaciones analíticas.
- **Eficiencia:** son instrumentos muy eficientes con una vida útil muy larga, además de ser económicos.

## 1.2.7 Emisión atómica

La espectroscopia de emisión atómica es un método instrumental de análisis químico fundamentado en el estudio de la radiación emitida por los distintos átomos que componen una muestra<sup>82</sup>. Esta radiación puede ser provocada por una llama, plasma, arco eléctrico o chispa que gracias a la cual, se puede llegar a determinar la proporción de un elemento presente en la muestra a analizar.

La espectroscopia de descomposición inducida por láser ("*laser-induced breakdown spectroscopy*"; LIBS)<sup>83</sup>, es un tipo de espectroscopia de emisión atómica que emplea como fuente de excitación láseres de alta energía (como los láseres pulsados), para generar un plasma del cual se obtiene la información relativa a los átomos presentes.

### 1.2.7.1 Láser pulsado (Nd:YAG)

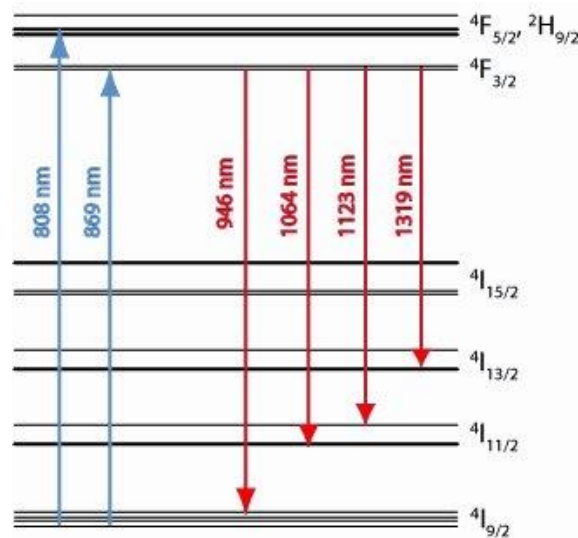
Es el láser de estado sólido más usado. Este tipo de láser usa como medio activo vidrios o cristales dopados con elementos de tierras raras o metales de transición. Posee un cristal de óxido de itrio y aluminio dopado con neodimio ( $\text{Nd:Y}_3\text{Al}_5\text{O}_{12}$ )<sup>84</sup>; el  $\text{Nd}^{3+}$  sustituye al  $\text{Y}^{3+}$ , por lo que no es necesaria una compensación de carga. La concentración normal del dopado en el cristal YAG es alrededor del 1 %.

La estructura cúbica YAG es dura, posee buena calidad óptica y alta conductividad térmica<sup>70</sup>. Este tipo de láseres sólidos pueden ser bombeados ópticamente con diodos láser o lámparas flash. La longitud de onda de emisión más común es de 1.064 nm, y a partir de ella se pueden obtener diferentes armónicos (532, 355 y 266 nm) a través del doblado, triplicado o cuadruplicado de la frecuencia (utilizando cristales no-lineales como KDP ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) o BBO ( $\text{BaB}_2\text{O}_4$ ), **figura 15**.



**Figura 15.** Láser de Nd:YAG (marca Surelite).

Al absorber la radiación proveniente de la lámpara, los átomos de Nd se excitan, y su población sobrepasa a la población del nivel inferior de energía. A esto se le conoce como inversión de la población (*vide supra*) y es un requisito para aumentar las probabilidades de la emisión estimulada. Este equipo es el láser de nanosegundos más utilizado en la actualidad y responde a un esquema de bombeo de 4 niveles energéticos, **figura 16**<sup>85</sup>.



**Figura 16.** Niveles energéticos láser Nd:YAG<sup>85</sup>.

Este tipo de láseres emiten pulsos con un tiempo de duración de entre 6 a 10 ns y una potencia de emisión que oscila entre 10 MW y 1 GW. Los pulsos emitidos por el láser son debidos al sistema de bombeo, que provoca la inversión de población. Por otro lado, este equipo dispone de un atenuador que impide que los fotones se reflejen en los espejos de la cavidad óptica y, por tanto, impide que un alto flujo de fotones atraviese el medio activo

amplificando la emisión estimulada. De este modo, el sistema de bombeo va incrementando la población de los átomos de Nd en niveles energéticos mayores.

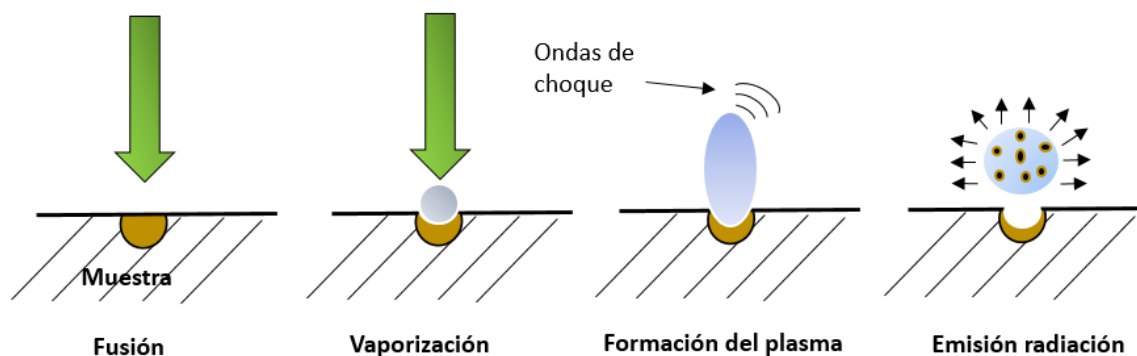
Los láseres de nanosegundos son capaces de emitir pulsos cortos (escala de nanosegundos) gracias al mecanismo Q-switch. Esta técnica consiste en colocar un atenuador variable dentro de la cavidad óptica. Este mecanismo puede ser de dos tipos: activo (requieren de una diferencia de potencial externa para funcionar) o pasivos (no requieren de estimulación externa). Los Q-switch activos generalmente consisten en un cristal tipo KDP ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) que posee propiedades electroópticas (cambio del índice de refracción en función del campo eléctrico aplicado). Por otro lado, los dispositivos tipo Q-switch pasivos son absorbentes saturables, que dejan pasar la radiación cuando han alcanzado la saturación<sup>82</sup>.

### 1.2.7.2 Espectroscopia de plasma inducido por láser

La espectroscopia de plasma inducido por láser (LIBS) es una técnica basada en laser pulsado que está siendo empleada en sectores muy variados en el ámbito tecnológico. Entre las aplicaciones más importantes cabe destacar aquellas de tipo industrial<sup>86</sup>, medioambiental<sup>87</sup>, geológico<sup>88</sup> o forense<sup>89,90</sup>; pasando por aquellas relacionadas con el Patrimonio Cultural<sup>91</sup>, seguridad<sup>92</sup> (especialmente la detección de explosivos o sus residuos), exploración espacial<sup>93,94</sup> y, en general, todas aquellas aplicaciones en las que el acceso a la muestra sea complicado o peligroso para el operador.

LIBS es una técnica consistente en la irradiación de un pulso láser sobre la superficie de la muestra, con la posterior generación de un plasma de la propia muestra<sup>95</sup>. El plasma es un estado fluido similar al estado gaseoso pero en el que determinada proporción de sus partículas están cargadas eléctricamente, confiriéndoles propiedades de conductores eléctricos que responden fuertemente a las interacciones electromagnéticas de largo alcance. El plasma tiene características propias que no se dan en los sólidos, líquidos o gases, por lo que es considerado otro estado de agregación de la materia. La temperatura que alcanza el plasma es de más de 15.000 K<sup>96</sup>, hecho que provoca la vaporización de una pequeña parte del material, una posterior ionización y final excitación atómica (ablacionando la muestra), **figura 17**. Si se pretende realizar un análisis elemental de la muestra, un detector capta la luz emitida por los átomos durante la vaporización,

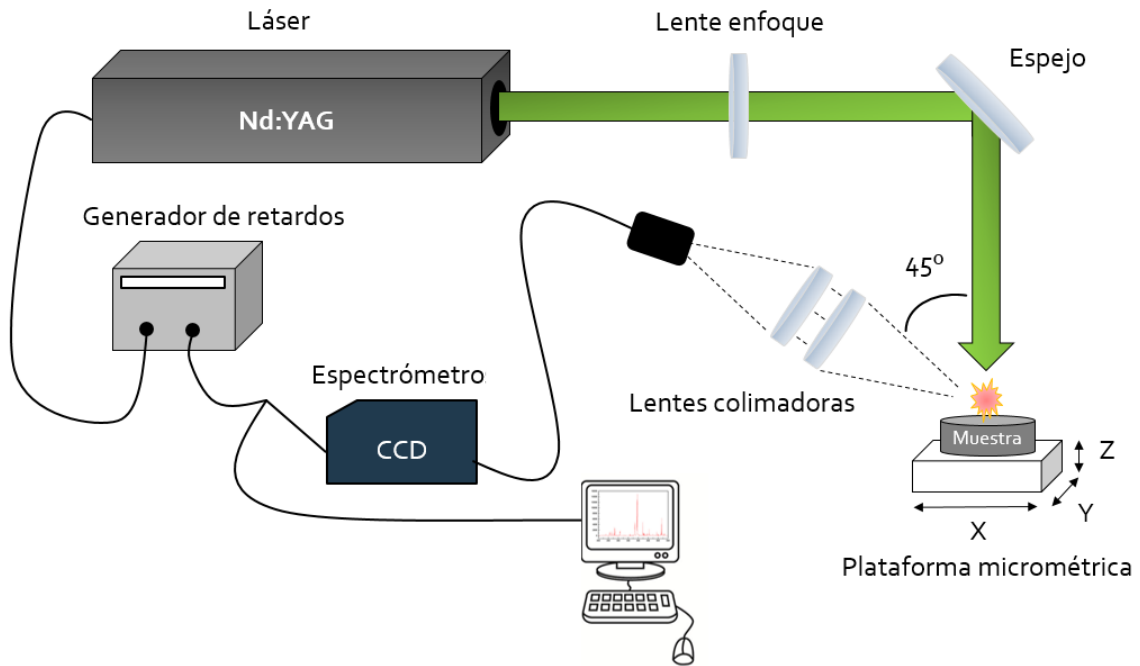
transformándolos en un espectro característico de los átomos presentes en el plasma. Esta técnica permite un rápido análisis elemental de una muestra, ya sea sólida, líquida o gaseosa<sup>83</sup>.



**Figura 17.** Proceso de generación del plasma.

Desde la década de los 60, con el descubrimiento de los láseres, la técnica ha evolucionado, con la invención del láser de Nd:YAG (láser de nanosegundos), el láser de femtosegundos y la implementación de láseres compactos y portables que pueden realizar pruebas de campo<sup>96</sup>. Hay una creciente demanda por el uso de la LIBS como herramienta de análisis elemental al poder obtener una elevada información analítica del plasma formado por el láser, es decir, el espectro de emisión característico de cada elemento que compone la muestra objeto de estudio. La intensidad de la banda espectral nos da la información necesaria para llevar a cabo un análisis cualitativo y cuantitativo de la muestra<sup>97</sup>.

La LIBS permite realizar, rápidamente, y con una instrumentación relativamente fácil de utilizar, **figura 18**, un análisis químico multi-elemental, además de no requerir una preparación previa de la muestra, ya que el propio láser realiza un micro-muestreo durante el proceso de medida, al ser enfocado sobre la muestra. Este hecho, unido a la directa e inmediata adquisición del espectro de emisión, confiere a la técnica la capacidad de obtener resultados en tiempo real.



**Figura 18.** Esquema de un sistema de LIBS.

En la **figura 18** se muestra un esquema de funcionamiento de una instalación LIBS. Cuando la luz pulsada incide sobre el material, hay una repentina subida de la temperatura, hecho que provoca la fusión de parte del material y su posterior evaporación, dando lugar a la generación de una nube de iones cargada (pluma). La luz generada por el plasma es recolectada por un colimador, pasando por la fibra óptica hasta un espectrómetro, donde se transforma la señal luminosa en señal eléctrica, **figura 18**. Analizando más pormenorizadamente la parte técnica de LIBS, relacionada con la parte analítica, se debería hablar de la ablación laser.

### 1.2.7.3 Ablación láser

La ablación láser es un procedimiento que se usa para quitar o extraer el material de la superficie de un sólido (de manera ocasional se puede usar en líquidos) mediante la irradiación de este con un rayo láser pulsado<sup>98</sup>. Cuando el flujo de radiación es bajo, la superficie del material se calienta al absorber la energía de los fotones del rayo y sublima, o se evapora. Cuando el flujo de radiación es muy intenso, usualmente, el material se transforma en un plasma. Normalmente, la ablación hace referencia a quitar material superficial mediante un pulso de radiación láser, pero también es posible conseguir la

ablación del material con un flujo continuo de esta radiación, si la intensidad de esta es lo suficientemente alta.

Se puede controlar la cantidad de energía absorbida y, de este modo, la cantidad de material de la muestra que se puede eliminar por la aplicación de un simple pulso. En concreto, esta absorción depende tanto de las propiedades ópticas y termodinámicas del material, como de la energía del láser incidente. El proceso se lleva a cabo controlando la duración de los pulsos láser, que pueden variar entre milisegundos y femtosegundos, y/o controlando la intensidad del flujo. Este control preciso hace que esta técnica sea muy valiosa tanto a nivel de investigación, como a nivel industrial, ya que con la ablación generada se puede determinar la composición elemental del material objeto de análisis (*vide supra*). El análisis del plasma inducido por láser puede realizarse tanto con espectrometría de masas como con técnicas ópticas<sup>99,100</sup>. En esta línea, existen estudios de ablación sobre gran número de materiales en fase sólida y líquida, entre los que cabría destacar el estudio de polímeros<sup>101</sup>, metales<sup>102</sup>, semiconductores<sup>103</sup>, dieléctricos<sup>104</sup>, etc. Los mecanismos fundamentales que describen la ablación láser solo se han conseguido describir parcialmente puesto que implica llevar el sistema material a estados muy alejados del equilibrio, de difícil diagnóstico y por lo tanto sean objeto de estudio. Este proceso depende de las propiedades termofísicas del material, de los parámetros del láser utilizado y de la formación y expansión del plasma, asociadas a una física y una hidrodinámica complejas. La dinámica de los iones y los electrones también presenta gran complejidad, ya que está determinada por campos eléctricos inhomogéneos (donde las propiedades pueden variar en ciertas ubicaciones del espacio) autogenerados en el propio plasma<sup>105</sup>.

Es importante destacar que todas las técnicas basadas fundamentalmente en tecnologías laser aportan una información detallada de la muestra objeto de estudio, por lo que es necesario contar con herramientas matemáticas adecuadas para extraer la máxima información que habitualmente se encuentra oculta en las medidas realizadas. Dado que los sistemas provenientes de tecnología láser poseen dinámicas no lineales<sup>106</sup>, es interesante la aplicación de herramientas matemáticas capaces de interpretar estas relaciones, como pueden ser algoritmos basados en inteligencia artificial y parámetros caóticos, entre otros<sup>107,108</sup>.

### 1.3 Quimiometría

Dentro de los métodos matemáticos de cálculo para el tratamiento de las señales de equipos analíticos, existen algoritmos de dinámica lineal o no lineal. Los sistemas lineales se definen como una combinación de elementos interrelacionados que forman una entidad colectiva. Un ejemplo de estos sistemas son los modelos de K vecinos más cercanos (kNN) o los modelos de regresión multiparamétricos. Los sistemas no lineales representan sistemas cuyo comportamiento no es expresable como la suma de sus descriptores. Cabe destacar dentro de este grupo a los modelos basados en parámetros caóticos y a las redes neuronales artificiales.

#### 1.3.1 Modelos Lineales

Este tipo de modelos presentan una relativa simpleza de cálculo, siendo una de las metodologías más usadas en la modelización y análisis de datos. Dentro de este grupo se va a definir dos tipos de modelos lineales que son: el método de los K vecinos y el método de regresión multiparamétrico.

##### 1.3.1.1 Método de los K vecinos más próximos

El método de los K vecinos más cercanos<sup>109</sup> (kNN, del inglés “*k Nearest Neighbors*”) es un modelo utilizado en “*data mining*” (minería de datos) y representa un algoritmo dentro del campo de “*machine learning*” (aprendizaje automático basado en inteligencia artificial). Es un algoritmo no supervisado que clasifica cada dato analizado, estimando la probabilidad de que pertenezca a un grupo de datos u otro en función de sus K vecinos, según la distancia o similitud con los demás elementos. El rendimiento del clasificador depende de la distancia que se utilice pudiendo afectar en gran medida a los resultados<sup>110</sup>. Realizada la fase de clasificación, se procedería a la fase de entrenamiento, donde se dividen los datos para utilizarlos en el proceso de aprendizaje y posterior verificación.

##### 1.3.1.2 Modelo de regresión multiparamétrico

Este tipo de modelos a diferencia de los modelos de regresión lineal simple, considera más de una variable independiente o explicativa ( $X_1, X_2, \dots, X_p$ ). Se basan en el estudio de la relación entre el conjunto de variables independientes y la variable dependiente o de interés Y, **ecuación 2**.

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \dots + \beta_p X_p + \varepsilon \quad (2)$$

En la **ecuación 2**,  $Y$  es la variable a predecir;  $\beta_0, \beta_1, \dots, \beta_p$  son parámetros a estimar y  $\epsilon$  es el error cometido en la predicción de los parámetros<sup>111</sup>.

### **1.3.2 Modelos no Lineales**

Este tipo de modelos son usados en sistemas complejos que presentan una no linealidad como puede ser los datos obtenidos en el campo de la biología o de la química entre otros. Dentro de este grupo podemos encontrar las redes neuronales artificiales o los sistemas caóticos.

#### **1.3.2.1 Redes neuronales artificiales**

La red neuronal artificial (RNA) es un algoritmo no lineal ampliamente utilizado debido a su versatilidad y potencia. Difiere de los métodos lineales tradicionales en su capacidad para encontrar adecuadamente las relaciones no lineales entre las variables analizadas dentro de una base de datos. Se tratan de modelos capaces de encontrar relaciones no lineales entre las diferentes variables independientes y dependientes presentes en la base de datos analizada. El mecanismo de estimación de las RNAs se basa en la interpolación, por lo que es importante destacar que dependen estrictamente del intervalo de los datos existentes y no proporcionan extrapolaciones fiables o precisas<sup>112</sup>.

La principal característica de una RNA es la capacidad que tiene para “aprender” Para realizar el proceso de aprendizaje, se le introduce a la red una serie de valores de entrada y salida. Empleando estos datos, la red modifica sus parámetros (matriz de pesos) hasta conseguir valores que sean capaces de reproducir la muestra, es decir, la red será capaz de generar salidas adecuadas con la introducción de nuevas entradas. Los aspectos que caracterizan a las redes neuronales son: la topología (o arquitectura), mecanismo de aprendizaje y la asociación entre los datos de entrada y salida. Atendiendo a la topología podemos distinguir las redes neuronales monocapa (perceptrón simple) de las redes multicapa (perceptrón multicapa). El primer tipo de red está definido por tener conexiones laterales entre neuronas, mientras que el segundo tipo posee de neuronas agrupadas en varios niveles al disponer de varias capas<sup>113</sup>.

### 1.3.2.2 Caos

El estudio de sistemas no lineales ha permitido analizar y caracterizar fenómenos irregulares que escapan a las técnicas de análisis clásicas. Durante muchos años los sistemas y modelos lineales han sido utilizados sistemáticamente para describir y modelar la dinámica de muchos sistemas físicos, químicos, económicos, etc. Sin embargo, en los últimos años se ha comprobado que algunos de los sistemas clasificados como no lineales pueden presentar dinámicas muy complejas que no pueden aproximarse mediante los modelos lineales clásicos<sup>26</sup>.

La teoría del caos es una rama de las matemáticas que trata sistemas dinámicos no lineales. Es de destacar que los sistemas caóticos son sensibles a pequeñas perturbaciones externas a pesar de poder estar definidos por ecuaciones deterministas (caos determinista). Actualmente, el número de sectores donde se han propuesto modelos caóticos para la descripción de sistemas no lineales es muy dilatado. Todo esto da como resultado una amplia aplicación<sup>114,115</sup> en diferentes ramas de la ciencia, como pueden ser tecnología de alimentos, química mediambiental, etc. Las tres características principales que cumplen los sistemas caóticos son la no-linealidad, la extrema sensibilidad que poseen ante cambios muy pequeños de sus condiciones iniciales y que no se puede estimar el comportamiento del sistema hasta que el proceso sucede.

Una forma de desarrollar los algoritmos se basa en definir parámetros caóticos fundamentados en las dimensiones fractales o también en parámetros como podrían ser los coeficientes de autocorrelación<sup>77</sup>. Con estos parámetros se podrían definir algoritmos lineales o no lineales pero complejos en sus parámetros, con los que se pueden describir sistemas no lineales y altamente dependientes de las condiciones iniciales.

Una vez conocidos los tipos de láseres utilizados y los tratamientos matemáticos que se van a utilizar en la memoria, se da paso al programa utilizado para el manejo del láser pulsado.

## 1.4 LabVIEW

Prácticamente toda la instrumentación aplicada en la tecnología química moderna está monitorizada por ordenador. Los softwares son cada vez más fáciles de usar, lo que posibilita a más investigadores utilizar instrumentos más complejos. El término LabVIEW es la denominación de un software que proviene de un acrónimo del inglés extraído de *“Laboratory Virtual Instrument Engineering Workbench”*. Este software es una herramienta de programación gráfica, originalmente focalizada para el desarrollo de aplicaciones tales como el control de equipos electrónicos<sup>116</sup> y de adquisición de datos<sup>117</sup>, entre otras aplicaciones.

LabVIEW, a diferencia de otros softwares de programación que utilizan lenguajes basados en texto para crear líneas de código, usa un lenguaje de tipo gráfico denominado G para crear programas en bloque en forma de diagrama. Este software fue desarrollado por la empresa *“National Instruments”* en 1983 y lanzado al mercado en el año 1986 (LabVIEW 1.0) para Macintosh. Actualmente, el software puede ser utilizado en los sistemas operativos Mac Os X, GNU/Linux y Microsoft Windows. LabVIEW dispone de librerías de funciones y herramientas de desarrollo útiles para la programación de herramientas en multitud de sectores tecnológicos<sup>118</sup>.

Los programas que se desarrollan con LabVIEW son denominados Instrumentos Virtuales (VIs) porque su aspecto y funcionamiento imitan a los instrumentos físicos, como osciloscopios o multímetros. Las VIs contienen una interfaz de usuario interactiva, que simula el panel de un instrumento físico y reciben instrucciones de un diagrama de bloques, que contiene la fuente código para el VI. Cada VI está compuesto por dos ventanas denominadas panel frontal y diagramas de bloques<sup>119</sup>.

- **Panel frontal.** Constituye la interfaz del usuario del VI. Es la parte visible para el usuario, y desde la cual se pueden manejar los controles e indicadores. Los controles pueden ser botones, diales, pulsadores, medidores, etc., que simulan los dispositivos de entrada de datos al diagrama de bloques del VI, **figura 19**. Los indicadores pueden ser gráficos, pantallas, medidores, “LEDs” indicadores..., todos los cuales simulan los dispositivos de salida del instrumento, datos de visualización

que el diagrama de bloques adquiere o genera. Cada control o indicador del panel frontal tiene su terminal correspondiente en el diagrama de bloques.

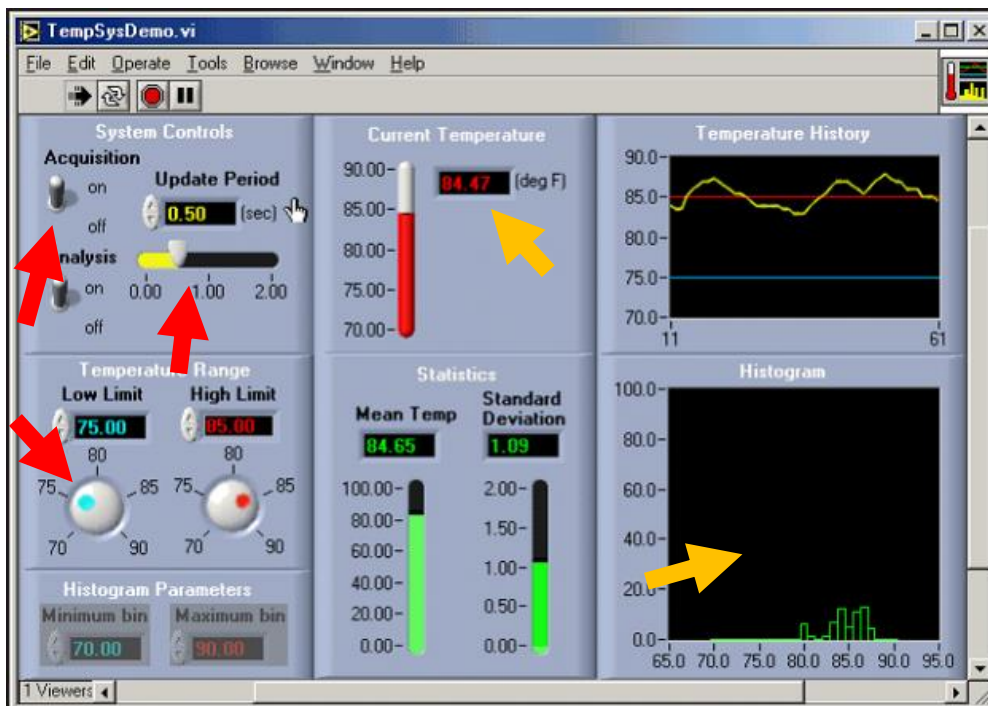
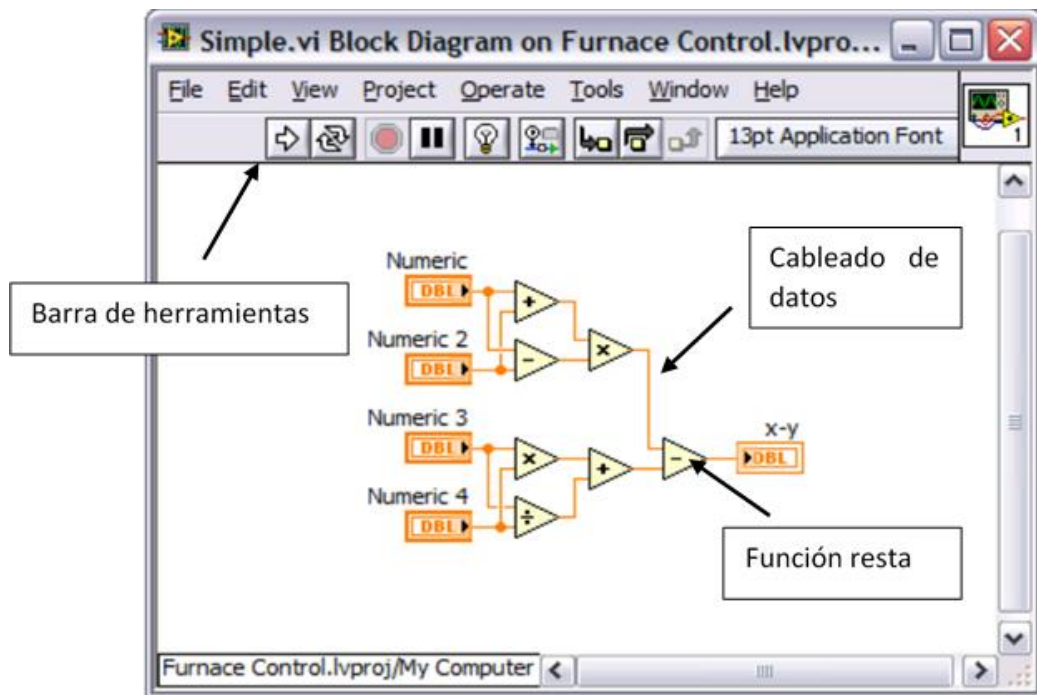


Figura 19. Panel frontal con controles (flecha roja) e indicadores (flecha amarilla).

- **Diagrama de bloques.** Es la parte donde se realiza la programación y contiene el código fuente del VI<sup>120</sup>. Los objetos del panel frontal aparecen como terminales en el diagrama de bloques. Los objetos que podemos encontrar en el diagrama de bloques incluyen terminales, subVis, funciones, constantes, estructuras y cables, los cuales transfieren datos junto con otros objetos del diagrama de bloques, figura 20.



**Figura 20.** Diagrama de bloques con la representación del código fuente.

LabVIEW ofrece numerosas ventajas como pueden ser la reducción del tiempo de desarrollo de aplicaciones, la posibilidad de crear soluciones completas ejecutables, incorporación de códigos de otros lenguajes como C o MATLAB, entre otros. Por otro lado, LabVIEW es un software de alto nivel que ofrece una facilidad de uso muy grande para usuarios con conocimientos básicos en la construcción de códigos informáticos. Otras características que ofrece LabVIEW son:

- ✓ Permite comunicarse con cualquier PLC (controlador lógico programable) del mercado industrial, como por ejemplo para el control de sistemas en minería.
- ✓ El lenguaje de programación gráfico (SCADA) permite monitorear el funcionamiento de diferentes procesos.
- ✓ Posibilita la interacción y realización de procesos automáticos, con Arduino u otro microcontrolador, como el control de accionamiento de máquinas, iluminación, etc., con herramientas de desarrollo y librerías de alto nivel específicas para aplicaciones.
- ✓ Ofrece cientos de funciones para el control, análisis y presentación de datos.
- ✓ Se pueden encontrar una gran cantidad de programas ejemplo, tanto en el software como por internet.

En este caso, el software LabVIEW viene siendo usado en ámbitos muy diversos tales como para la monitorización de HPLCs<sup>121</sup>, la creación de simulaciones de diseño y caracterización de láseres de Ti:Zafiro<sup>122</sup>, herramientas de adquisición y filtrado de datos<sup>123</sup>, control y supervisión de procesos de coagulación y floculación de aguas<sup>124</sup>, sistemas de control de láser de femtosegundos<sup>125</sup> o como una simple herramienta para llevar a cabo un control remoto de diferentes dispositivos ubicados en un mismo laboratorio<sup>126</sup>. Dada su versatilidad y principales características, esta herramienta ha sido implementada en la realización de esta memoria de investigación. Fue utilizada para el manejo de los diferentes parámetros del láser pulsado, facilitando el uso y manejo a la hora de optimar los parámetros de medida de muestras.

## 1.5 Objetivos

La industria alimentaria siempre ha sido objetivo de actividades fraudulentas que han llevado a numerosos problemas de salud. Son numerosos los casos de alimentos adulterados, siendo difícil llevar un control exhaustivo de todos ellos, por lo que se hace indispensable una herramienta capaz de medir de manera rápida y con resultados óptimos.

En esta Tesis se pretende diseñar y aplicar equipos basados en diferentes tipos de láseres para llevar a cabo el control de calidad de los alimentos. Para este control se utilizará la espectroscopia de plasma inducido por láser y la espectroscopia de fluorescencia, mediante láser pulsado y continuo respectivamente. Los alimentos propuestos (miel, aceites comestibles y vinagres) son objeto prioritario (entre los 10 más adulterados) de actividades fraudulentas. En concreto, el objetivo principal que se busca es verificar la valía de las técnicas basadas en láseres pulsados y continuos. Las señales generadas por estas técnicas han sido tratadas por algoritmos caóticos y redes neuronales artificiales como herramientas quimiométricas de análisis de diferentes alimentos para verificar su calidad y/o adulteración con otros alimentos de peor calidad, siempre intentando buscar las detecciones en muestras adulteradas por debajo del 10%.

Asimismo, uno de objetivos secundarios que se busca es el diseño y validación de una herramienta portátil que pueda medir muestras *in situ* de forma sencilla sin tener que llevar a cabo ningún pretratamiento de las muestras objeto de análisis. Además de poder

ofrecer una alternativa en cuanto a la rentabilidad del proceso al no tener realizar ningún tipo de pretratamiento.





AVOID EXPOSURE  
Invisible and/or Visible  
laser radiation is emitted  
from this aperture.  
310-0040 REV 5B

CLOSED

OPEN

AVOID EXPOSURE  
INVISIBLE AND/OR VISIBLE  
LASER RADIATION IS EMITTED  
FROM THIS APERTURE  
DANGER OF SCATTERED RADIATION  
ENERGY PULSE  
PULSE DURATION  
WAVELENGTHS  
CLASS IV LASER PRODUCT

**Materiales y Métodos**



## **2. Materiales y métodos**

En este apartado tendrán cabida los alimentos utilizados en el desarrollo de este trabajo, así como los equipos y software usados para llevar a cabo la experimentación y análisis de datos.

### **2.1 Alimentos analizados**

Los diseños de los experimentos llevados a cabo en esta Tesis han sido enfocados en base a las experiencias reales de la vida cotidiana, a los procesos de producción y a las posibles actividades fraudulentas, realizadas de manera consciente o accidental sobre alimentos de un uso muy extendido a nivel social. Todo en pro de un sistema de producción de mayor calidad, mejor controlado y con mayores garantías si cabe de que el producto alimentario final sea fiel reflejo de sus especificaciones. Con este fin, diversos alimentos como el aceite de oliva virgen extra, la miel o el vinagre han sido analizados por medio de equipos de láser pulsado y continuo.

Dentro de la lista de los alimentos que más frecuentemente se adulteran se encuentra: el aceite de oliva virgen extra, la leche, la miel, el azafrán, el pescado, los cereales, el vino, el café y determinados zumos de frutas<sup>34,35</sup>. Es por lo que algunos de estos alimentos han sido seleccionados para su análisis con los equipos y prototipos que se proponen.

A continuación, se describen y exponen las principales cualidades de los tres tipos de alimentos analizados durante la investigación.

#### **2.1.1 Aceite de oliva virgen extra**

El aceite de oliva virgen extra (AOVE) es una pieza clave de la dieta mediterránea<sup>26,127</sup>. Es considerado como “oro líquido” por sus características organolépticas y sus beneficios para la salud<sup>128</sup>. Como valores nutricionales, cabría destacar su contenido en vitaminas (A, D, E y K), polifenoles y ácidos grasos esenciales, entre otros. Además del alto valor nutricional, el AOVE presenta numerosos beneficios para la salud como:

- Promueve la disminución del colesterol LDL (low-density lipoproteins; lipoproteínas de baja densidad) y mantiene o aumenta el HDL (high-density lipoproteins; lipoproteínas de alta densidad), ayudando a reducir el riesgo de enfermedades coronarias.

- Evita problemas gastroduodenales al poseer vitaminas liposolubles (E y A), formando una película que previene la formación de úlceras.
- Mejora el control metabólico de la diabetes.
- Fortalece el sistema inmunológico gracias a los antioxidantes y nutrientes esenciales.

El AOVE está compuesto por una fracción saponificable (98-99 % del peso total) y otra insaponificable (1-2 % del peso total). La parte saponificable está formada por triglicéridos, diglicéridos, monoglicéridos y ácidos grasos libres<sup>129</sup>. Por su parte, la fracción insaponificable está compuesta por tocoferoles, esteroides, pigmentos, compuestos fenólicos y volátiles, entre otros<sup>130</sup>. La composición de las fracciones del aceite está directamente relacionada con la variedad de la aceituna, el clima, el suelo donde se cultive, el grado de maduración de la aceituna..., así como de las operaciones relacionadas con su elaboración y almacenamiento. Este producto se obtiene mediante el prensado en frío de las aceitunas recogidas idealmente en el momento óptimo de madurez.

### **Tipos de aceite**

El proceso de producción del AOVE es importante, ya que dará lugar a una mayor o menor calidad de este<sup>131</sup>. La calidad del AOVE producido está basada en sus propiedades organolépticas y en el contenido de los ácidos grasos libres entre otras características. Según estos criterios podemos distinguir diferentes categorías (Reglamento (UE) Nº 1308/2013 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 17 de diciembre de 2013) que son:

**A) Aceite de oliva virgen:** aceite obtenido del prensado en frío de las olivas por medios mecánicos o procedimientos físicos que no alteren el producto. En esta categoría encontramos:

-Aceite de oliva virgen extra (AOVE): es el aceite de máxima calidad. No presenta defectos organolépticos y muestra un grado de acidez menor o igual a 0,8°.

-Aceite de oliva virgen (AOV): aceite de buena calidad, pero con peores propiedades organolépticas que el AOVE. Presenta una acidez menor o igual a 2°.

-Aceite de oliva lampante: presenta la peor calidad, con unas características organolépticas pobres. Tiene una acidez mayor a 2° y no es apto para la venta al público consumidor.

**B) Aceite de oliva refinado:** está aceite de oliva obtenido del refinado de aceite de oliva virgen o lampante con una acidez menor a 0,3°.

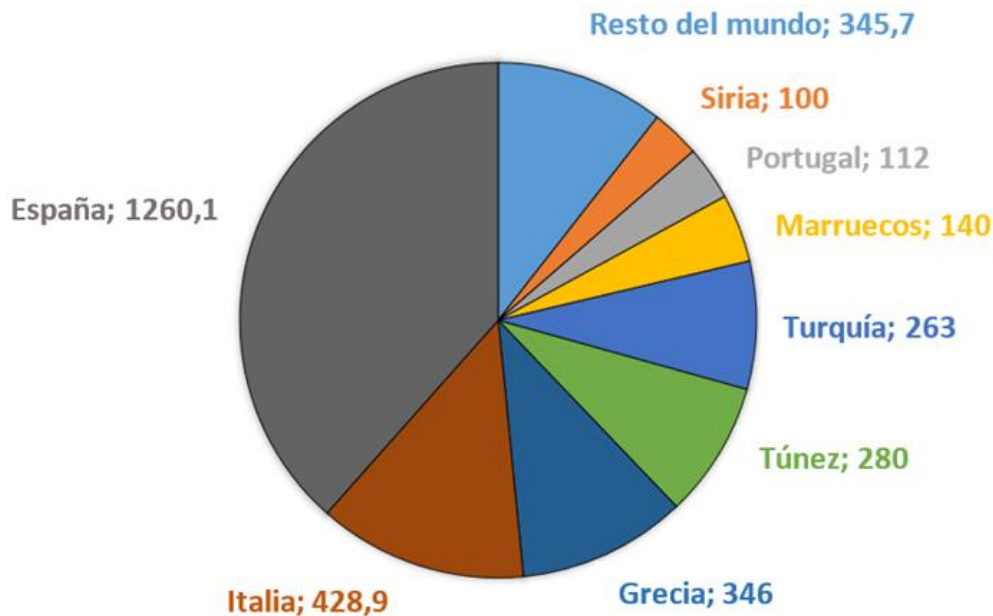
**C) Aceite de oliva (compuesto de mezclas de aceites de oliva refinados y de aceites de oliva vírgenes):** aceite de oliva obtenido del mezclado de aceite de oliva refinado y aceite de oliva virgen. La acidez mostrada es menor o igual a 2°.

**D) Aceite de orujo de oliva crudo:** aceite obtenido del orujo de la oliva mediante disolventes o métodos físicos. El orujo de oliva es un subproducto resultado de la extracción de aceite de oliva y está formado por piel, huesos, agua y una cantidad residual de aceite de oliva.

**E) Aceite de orujo de oliva refinado:** aceite que se obtiene del refino del aceite de orujo de oliva crudo y presenta una acidez menor o igual a 0,3°.

**F) Aceite de orujo de oliva:** se obtiene del mezclado del aceite de orujo de oliva refinado y el aceite de oliva virgen. Tiene una acidez menor o igual a 1°.

En cuanto a producción mundial, España es líder respecto al AOVE (**figura 21**), seguido de Italia y Grecia. Existen más de 260 variedades de aceituna, de las cuales 18 son las principalmente usadas en nuestro país. Las variedades más destacadas son: Picual, Arbequina, Hojiblanca y Cornicabra.



**Figura 21.** Producción mundial de aceite de oliva en miles de toneladas. Datos de la campaña 2017/2018. Fuente: consejo oleícola internacional (COI).

Teniendo en cuenta el elevado valor añadido que presentan estos tipos de aceites, son el objeto fundamental de las adulteraciones o acciones fraudulentas. Estas actividades fundamentalmente se centran en la mezcla con aceites de peor calidad o compuestos químicos de bajos precios para poder conseguir beneficios económicos mayores. Aquí es donde radica la complicación, es decir, una mezcla de aceites de distintas calidades, pero no con fines nutricionales sino de beneficio económico. Esto deriva en un fraude alimentario<sup>28</sup> y en un potencial peligro para la salud, ya que podría ser el resultado de intoxicaciones que fuesen perjudiciales para el consumidor.

### **Calidad del aceite**

En el Reglamento (CEE) N°2568/91 de la Comisión de 11 de julio de 1991, se recogen las características que debe presentar un aceite de oliva para poder categorizarlo como virgen extra, virgen, lampante, oliva u orujo. Entre los parámetros químicos encontramos características tales como grado de acidez, índice de peróxidos o coeficientes de extinción ( $K_{232}$  y  $K_{270}$ ) (**tabla 2**), descritos a continuación:

- *Grado de acidez*: determina la cantidad de ácidos grasos libres, expresado en tanto por ciento de ácido oleico.

- *Índice de peróxidos*: mide el estado de oxidación de un aceite o, lo que es lo mismo, el deterioro de los antioxidantes presentes de manera natural.

- *Coefficientes de extinción*: muestran información acerca de la calidad de un aceite y el estado de conservación del mismo. Los valores se obtienen mediante pruebas espectrofotométricas en el rango de longitudes de onda ultravioleta. El dato obtenido indica la presencia de compuestos de oxidación secundaria en el aceite; cuanto menor sea su valor, mayor será la calidad del aceite.

**Tabla 2.** Resumen de características de los diferentes aceites de oliva

	Aceite de oliva virgen extra	Aceite de oliva virgen	Aceite de oliva lampante	Aceite de oliva	Aceite de orujo de oliva
Grado de acidez (%)	≤ 0,8	≤ 2,0	> 2,0	≤ 1,0	≤ 0,3
Índice de peróxido (mEq O <sub>2</sub> /kg)	≤ 20	≤ 20	—	≤ 15	≤ 15
K <sub>232</sub>	≤ 2,50	≤ 2,60	—	—	—
K <sub>270</sub>	≤ 0,22	≤ 0,25	—	≤ 1,15	≤ 1,70

Además de los parámetros químicos descritos, se realizan evaluaciones organolépticas por un panel de catadores expertos que determinan los posibles defectos presentes como el aroma, sabor y color. Como se ha descrito con anterioridad, las características de un aceite dependen del momento en que se recolecta la aceituna, de las condiciones agronómicas y del proceso de fabricación para extraer el zumo de la aceituna. Los productores, para poder autenticar su producto y protegerlo de posibles adulteraciones, añaden al etiquetado el origen geográfico del AOVE. En este sentido, según el Reglamento (UE) N° 1151/2012, se añade la categoría de DOP al etiquetado, como valor añadido del mismo<sup>132</sup>. Cabe destacar que además del proceso de producción en la almazara, la calidad de un aceite puede verse afectada en la cadena de distribución o en el almacenaje. La luz, la temperatura y el contacto con oxígeno son factores que influyen en la conservación del aceite degradándolo. La variación del grado de acidez, índice de peróxidos, coeficientes

de extinción y contenido en carotenoides y clorofilas son indicadores de la calidad del AOVE <sup>133</sup>.

Cuando un aceite se encuentra expuesto a la luz, se promueve la fotooxidación, mientras que si está en presencia de aire, se produce la oxidación térmica. Por esta razón, el envase juega un papel fundamental en la calidad del producto <sup>134</sup>.

### **Aceites usados en la experimentación**

En los diferentes experimentos desarrollados, se usaron AOVE y aceites de semillas (maíz, almendra, girasol y soja), y se midieron muestras de AOVE puras y sus mezclas con aceites de menor calidad u origen, **tabla 3**.

**Tabla 3.** Aceites usados en la experimentación

Variedad	Marca	DOP
Arbequina	Marqués de Griñón	-
Cornicabra	Enclaves D.Oro	Montes de Toledo, España
Picual	Castillo de Tabernas	-
Mezcla	Mezcla de AOVE	-
Picual	Sapura	Sierra de Segura, España
Hojiblanca, Arbequina, Manzanilla, Picual y Lechín de Sevilla	Oleoestepa	Estepa, España
Picudo, Lechín, Chorrúo, Hojiblanca y Picual	Duque de Baena	Baena, España
Noellara del Belice, Biancolilla y Cerasuola	Planeta	Val Di Mazara, Italia
Picual	Señorío de Segura	Sierra de Segura, España
Verdeal, Madural, Cobrancosa y Negrita de Freixo	Quinta do Vallouto	Tras-os-montes, Portugal
Hojiblanca	Hojiblanca	-
Aceite de soja	Laboratorios Manuel Riesgo	-
Aceite de almendra	Laboratorios Manuel Riesgo	-
Aceite de Maíz	Koipesol	-
Aceite de Girasol	Koipesol	-

### 2.1.2 Miel

La miel es el producto alimenticio producido por las abejas melíferas<sup>135</sup> a partir del néctar de las flores, de las secreciones procedentes de partes vivas de las plantas o de excreciones de insectos succionadores que quedan sobre partes vivas de plantas. Las abejas recogen, transforman, almacenan y dejan madurar el alimento en los panales de la colmena. Su composición es variada (**tabla 4**) y fundamentalmente está formada por agua, fructosa, glucosa, además de otras sustancias en muy baja proporción como son ácidos, minerales, aminoácidos, proteínas, enzimas, compuestos volátiles, etc.

**Tabla 4.** Composición de la miel<sup>136,137</sup>.

Compuesto	Porcentaje
Hidratos de carbono	75-80 %
Agua	15-20 %
Proteínas	Hasta 0,4 %
Minerales	Hasta 1 %
Vitaminas	B, C y K
Calorías	~3,3 kcal/gr

La miel, por su contenido en minerales y enzimas, tiene numerosos beneficios para la salud, como por ejemplo mitigar los trastornos intestinales y de garganta. Aumenta los niveles de hemoglobina en sangre y facilita la retención de calcio además de poseer propiedades antibióticas. Por estas razones, se usa en la producción de medicamentos y en la fabricación de alimentos, a parte de su consumo directo<sup>136</sup>.

## Tipos de miel

Los tipos y las variedades de miel vienen reglamentariamente regulados atendiendo a tres factores<sup>138</sup>: origen, destino y tipo de procesado.

Atendiendo a su origen: este es el parámetro que caracteriza más habitualmente a la miel desde un punto de vista comercial. Dentro de este apartado se pueden encontrar dos grandes grupos:

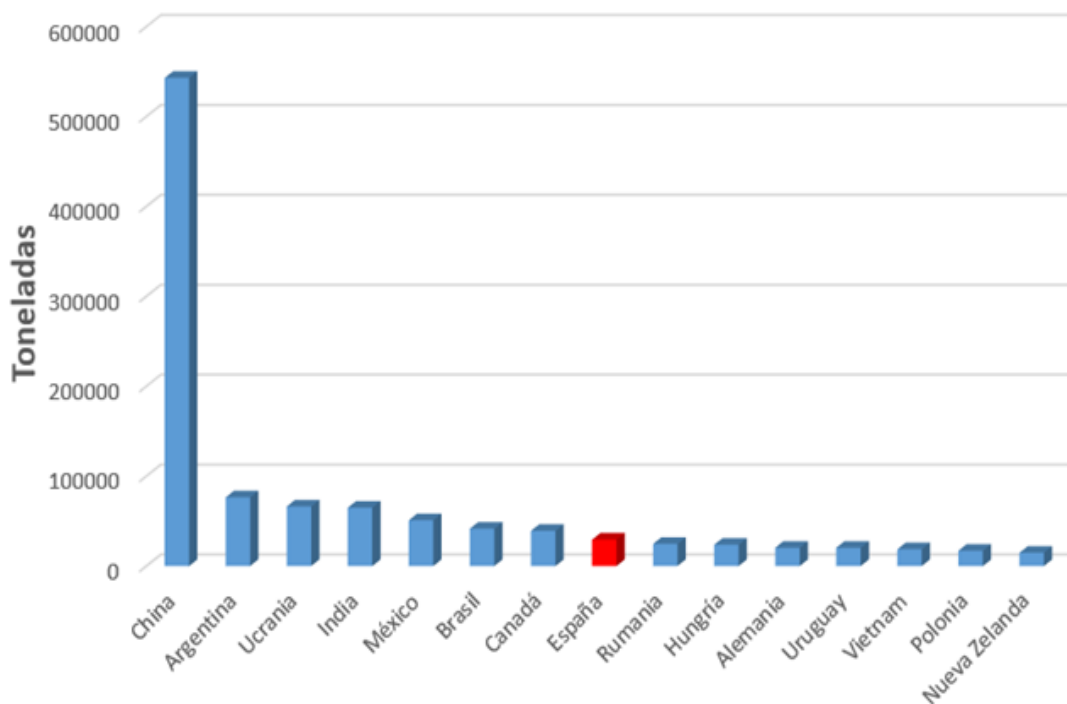
- Miel floral (obtenida por las abejas a partir del néctar de las flores). Según el tipo de flores se puede distinguir entre la miel unifloral o monofloral, en las que predomina el néctar de una sola especie botánica, y la miel polifloral o milfloral, que proviene del néctar de distintas especies botánicas.
- Miel de mielatos, también llamadas mieles de bosque o mieladas (se obtienen de encinas, robles, castaños y alcornoques). Procede principalmente de excreciones de insectos succinadores, que dejan en las partes vivas de las plantas o de secreciones de partes vivas de las plantas. Son mieles más oscuras y con menor contenido de azúcares.

Atendiendo al destino de la miel: la clasificación de las mieles también puede atender a la aplicación del producto. Es decir, la miel puede ser empleada para el consumo humano directo sin ninguna aplicación intermedia o puede estar destinada a otros fines alimentarios o industriales, ya sea como aditivo o utilizándola en el ciclo de fabricación de otros alimentos.

Atendiendo al tipo de procesado: en este caso la miel puede ser fabricada y vendida con fragmentos de panal, puede ser centrifugada para extraer este producto del panel donde ha sido producido, también ha podido ser producida por medio de procesos de prensado con el objetivo de extraer la mayor cantidad de miel y, finalmente, con este mismo objetivo puede ser también filtrada.

Son numerosos los países productores de miel, siendo España uno de los diez mayores fabricantes de miel del mundo (**figura 22**). Según datos del Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente, la calidad de nuestra miel es muy apreciada<sup>139</sup>, es

por eso que, en 2016, de 31.000 toneladas producidas, 27.000 fueron destinadas a la exportación.



**Figura 22.** Producción mundial de miel en el año 2017. Fuente: FAO.

### **Calidad de la miel**

De acuerdo con las normas del Codex Alimentarius<sup>140</sup> y del concilio relativo a la miel de la UE (Directiva (2001/110/CE)) y del Real Decreto 1049/2003, de 1 de agosto, las características o parámetros que deben cumplir las mieles se resumen en la **tabla 5**. Además de los parámetros descritos, se realizan evaluaciones organolépticas por un panel de catadores expertos que determinan los posibles defectos presentes como el sabor o la viscosidad entre otros.

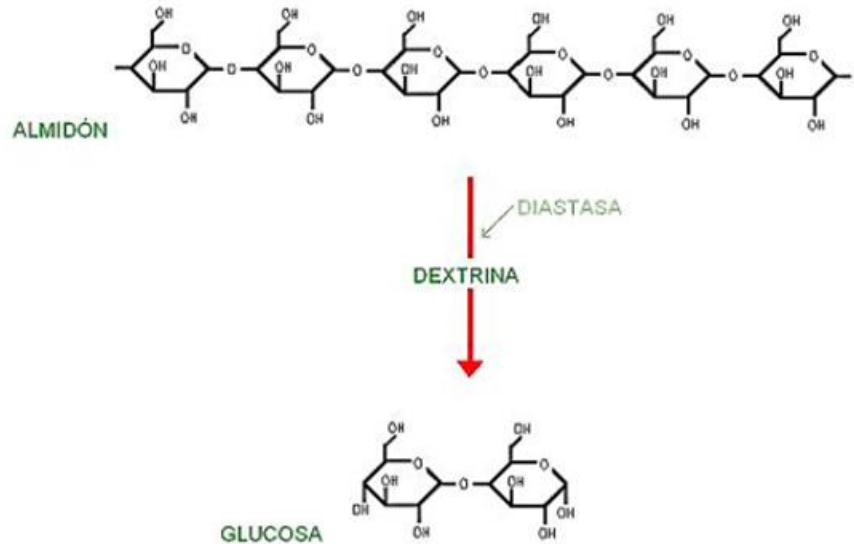
**Tabla 5.** Parámetros de calidad de la miel de acuerdo con las normas del Codex Alimentarius y del concilio relativo a la miel de la UE.

Parámetro	Contenido
Contenido en agua	No puede ser superior al 20 %
Sólidos insolubles en agua	No más de 0,5 g/100 g
Contenido en azúcares	No menos de 60 g/100 g en miel de flores No menos de 45 g/100 g en miel de mielada
Ácidos libres	No más de 50 meq/Kg en la miel en general No más de 80 meq/Kg en la miel para uso industrial
Conductividad eléctrica	No menos de 0,8 mS/cm en miel de mielada o miel de castaño No más de 0,8 mS/cm en miel en general y mezclas
Índice diastático (escala Schade)	No menos de 8 en general, a excepción de mieles de uso industrial
Hidroximetilfurfural (HMF)	No más de 40 mg/Kg en general, a excepción de mieles de uso industrial

Además de los parámetros descritos, se realizan evaluaciones organolépticas por un panel de catadores expertos que determinan los posibles defectos presentes como el sabor o la viscosidad entre otros.

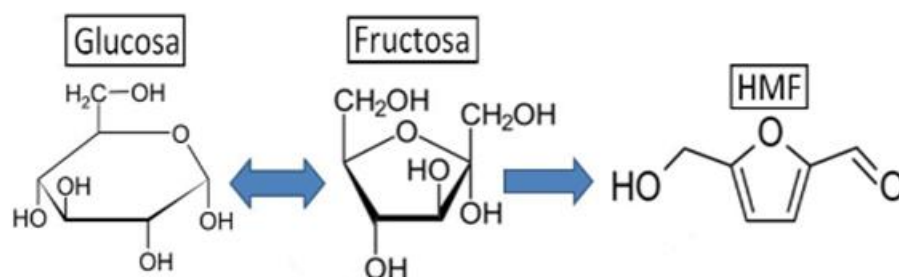
Los parámetros indicadores de la calidad de la miel (además de las propiedades organolépticas y la humedad entre otros), son el índice de diastasas y el contenido de hidroximetilfurfural (HMF). Ambos son indicadores de la frescura de la miel y de las condiciones de almacenamiento y procesado <sup>141, 142</sup>. Las diastasas son enzimas de origen vegetal, que catalizan la hidrólisis del almidón en dextrina, para posteriormente

transformarlo en azúcar (convierte azúcares complejos en simples (**figura 23**)). Esta enzima es sensible al calor y al almacenamiento prolongado, dando lugar a su inactividad. Mientras mayor sea el índice de diastasa, mayor será la calidad de la miel.



**Figura 23.** Reacción de la enzima diastasa.

Por otro lado, el HMF es un aldehído que se obtiene de la degradación de los azúcares, mediante la deshidratación de la fructosa y de la glucosa en medio ácido, **figura 24**. La presencia de este compuesto está directamente relacionada con las propiedades organolépticas de la miel, como son el cambio de color, sabor y olor.

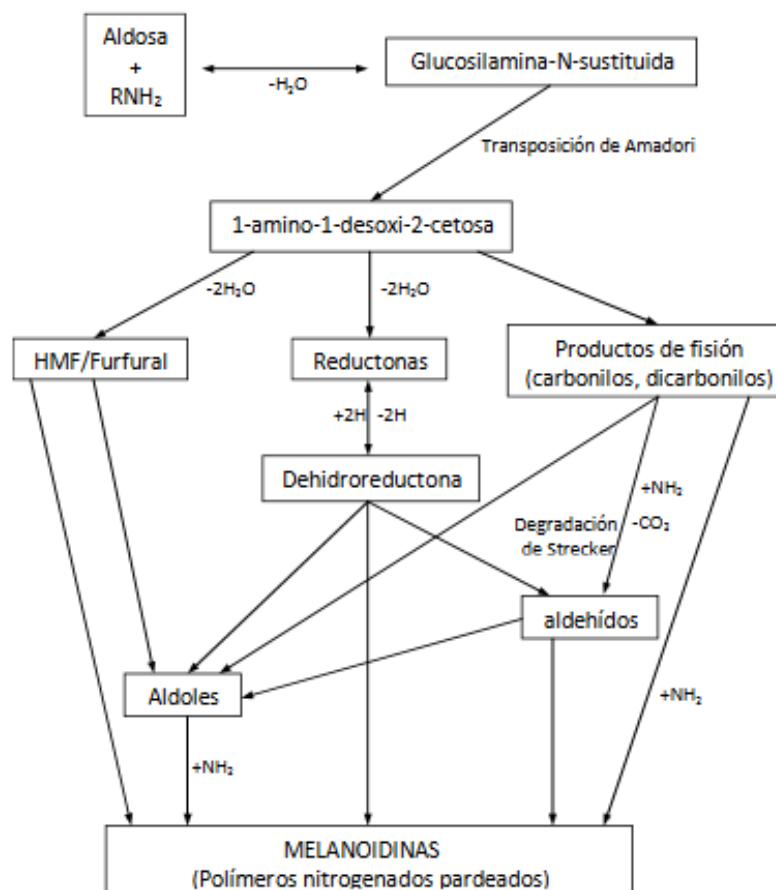


**Figura 24.** Reacción de deshidratación de glucosa y fructosa a HMF.

La miel extraída con una manipulación correcta presenta un contenido de HMF bajo, que varía dependiendo del pH y de las condiciones de calentamiento y almacenamiento<sup>143</sup>. Su valor va en aumento según el grado de envejecimiento y el calor al que ha sido sometida<sup>144, 145</sup>. Un aumento en el valor de HMF va en detrimento de la calidad que presenta la

miel. La determinación de HMF no sólo podría alertar de las condiciones a las que han sido sometidas las mieles, sino también poder detectar una posible adulteración. Esto se debe a que las muestras adulteradas con jarabes, siropes o azúcares invertidos muestran unos valores de HMF más altos que los presentados por las mieles de manera natural.

El HMF es uno de los compuestos principales formados en la reacción de Maillard, **figura 25**. Esta reacción se compone de un complejo conjunto de reacciones químicas que dan lugar a la formación de pigmentos pardos (melanoidinas). Ocurre en los alimentos cuando un azúcar reductor o lípido oxidado y un grupo amino de aminoácido, péptido o proteína, sufren un proceso de calentamiento a altas temperaturas (esterilización) y/o conservación durante largos periodos a temperatura ambiente <sup>146</sup>.



**Figura 25.** Esquema de la reacción de Maillard <sup>147</sup>.

Como se ha mencionado anteriormente, la miel es uno de los alimentos más adulterados. Los orígenes de estas adulteraciones pueden ser debidas a adulteraciones accidentales o producidas de manera intencionada:

- A. **Adulteraciones accidentales:** provocadas por las condiciones de almacenamiento, la maquinaria utilizada en su producción, los recipientes donde están contenidas o por una mala manipulación.
- B. **Adulteraciones intencionadas:** en este caso, la miel es mezclada directamente con adulterantes baratos para obtener mayor beneficio económico como pueden ser fructosa, glucosa, sirope de maíz, sirope de arroz o azúcar de caña entre otros productos <sup>148</sup>.

### **Mieles usadas en la experimentación**

Los diferentes tipos de mieles y sirope usados en el desarrollo de este trabajo quedan recogidos en la **tabla 6**.

**Tabla 6.** Tipos de mieles usadas en la experimentación.

Origen botánico	Marca	Origen geográfico
Miel de Naranja	Luna de Miel	España
Miel de Acacia	Luna de Miel	España
Miel de Limón (Ecológica)	Bona MEI	España
Miel multifloral	Granja San Francisco	España
Miel de Eucalipto	Luna de Miel	España
Miel de Tomillo	El Brezal	España
Miel de Romero	La obrera	España
Miel de Castaño (Ecológica)	Hijas del Sol	España
Sirope de arroz	Danival	Francia

### 2.1.3 Vinagre

El vinagre ha formado parte de la alimentación humana desde la antigüedad (consumido por egipcios, griegos y romanos), ya fuese como condimento o en forma de conservante. Este producto se puede obtener de una amplia variedad de materias primas de origen agrícola<sup>149</sup>. En el proceso de producción tiene lugar una doble fermentación, alcohólica y acética. En primer lugar, y mediante la acción de levaduras, los azúcares son transformados en etanol. Seguidamente, y por la acción de bacterias, el etanol sufre un proceso de oxidación obteniendo como producto ácido acético<sup>150</sup>.

El vinagre de vino es de entre los vinagres el más consumido en los países mediterráneos. Dentro de este tipo de vinagres podemos encontrar vinagres de alta calidad como son los etiquetados con DOP. Con esta denominación tenemos tres vinagres: Vinagre de Montilla-Moriles, Vinagre de Jerez y Vinagre del Condado de Huelva (Boletín Oficial del Estado (BOE). Resolución de 24 de marzo de 2009). Durante la crianza del vinagre de Jerez, los vinagres pasan en barricas de madera de roble periodos de 6 meses, 2 años o 10 años según se quiera obtener Vinagre de Jerez, Vinagre de Jerez Reserva o Vinagre de Jerez Gran Reserva, respectivamente (BOE. Real Decreto 661/2012, de 13 de abril). Durante el periodo almacenado en barrica, adquiere unas características específicas proporcionadas por el propio recipiente, dotándolo de un valor añadido<sup>151</sup>.

El vinagre es una matriz compleja compuesta por proteínas, carbohidratos, vitaminas, aminoácidos y compuestos fenólicos. El consumo de este producto ofrece varios beneficios para la salud, como son<sup>152,153</sup>:

- Reduce el azúcar en sangre.
- Proporciona propiedades antioxidantes.
- Mejora de la salud cardíaca al disminuir los niveles de colesterol y triglicéridos.
- Ayuda en la prevención de síntomas y enfermedades como hipertensión, cáncer o ataques cardíacos.

## **Tipos de vinagres**

Sabiendo que el vinagre puede obtenerse de cualquier producto de origen agrícola que contenga almidón y/o azúcares, podemos encontrar en el mercado numerosos tipos de vinagres (BOE. Real Decreto 661/2012, de 13 de abril), entre los que cabe destacar:

- Vinagre de vino: obtenido por fermentación acética del vino, ya sea tinto o blanco.
- Vinagre de frutas: se obtiene mediante fermentación alcohólica y acética de frutas.
- Vinagre de alcohol: obtenido por fermentación acética de alcohol de cereal o alcohol de melaza.
- Vinagre de malta: se obtiene mediante una doble fermentación (alcohólica y acética) de la cebada malteada.
- Vinagre de sidra/manzana: se elabora a partir de la pulpa de manzana o de su zumo.
- Vinagre de arroz: se obtiene mediante la fermentación del arroz.

En el año 2018 y más concretamente en España, se produjeron alrededor de 1,65 millones de hectolitros de vinagre de vino, de los cuales 560.000 pertenecían a vinagres con denominación de origen (Jerez, Montilla-Moriles y Condado de Huelva). El consumo español de vinagre (1,5 litros persona/año) está por debajo de países como Bélgica (2,7 litros per cápita), seguido de Alemania con 2,2 y Francia 1,9 litros <sup>154</sup>.

## **Calidad del vinagre**

La calidad de un vinagre depende principalmente de la calidad de la materia prima utilizada para su elaboración y del propio proceso de elaboración. Para poder evaluar y caracterizar la calidad de un vinagre es necesario llevar a cabo un análisis químico y sensorial. Según el Real Decreto 661/2012, de 13 de abril, los vinagres deben presentar una serie de características que son:

- 1) Contenido de C<sup>14</sup> ligado a su origen botánico
- 2) Acidez total (gramos de ácido acético por litro):
  - a. Vinagre de vino: 60 g/l como mínimo.
  - b. Otros: 50 g/l como mínimo.
- 3) Contenido metanol  $\leq 0,5$  g/l.

- 4) Alcohol residual:
- Vinagre de vino: 1,5 por 100 V/V como máximo.
  - Vinagres con DOP: establecido en el pliego de condiciones correspondiente.
  - Otros: 0,5 por 100 V/V como máximo.
- 5) Extracto seco:  
 Vinagre de vino:  $\geq 1,2$  gramos por litro y grado de ácido acético.
- 6) Acetoína:  
 Vinagre de vino:  $\geq 30$  mg/l.

En cuanto al análisis sensorial, un panel de catadores determina la calidad de un vinagre mediante el análisis del color, olor y sabor.

### **Vinagres usados en la experimentación**

Los diferentes tipos de mieles usados en el desarrollo de este trabajo quedan recogidos en la **tabla 7**.

**Tabla 7.** Tipos de vinagres usados en la experimentación.

Variedad	Marca	DOP	Origen
Vinagre de Jerez DOP	Parra	Manzanilla-Sanlúcar de Barrameda	España
Vinagre de arroz	Kong Yen	-	Taiwan
Vinagre de vino blanco	Marca Guía		España
Vinagre de sidra	Marca Guía		España
Vinagre de melaza	Vinapar		España

### **Otros alimentos analizados como estudios preliminares**

Además de los alimentos previamente mencionados, se midieron diferentes muestras de pescado, diferentes vinos (amontillado, fino, manzanilla y oloroso), tomate de tetrabrik, cáscara de mandarina/naranja y patata, además de muestras de hierro y cobre, para poner a punto las herramientas de medida (*vide infra*).

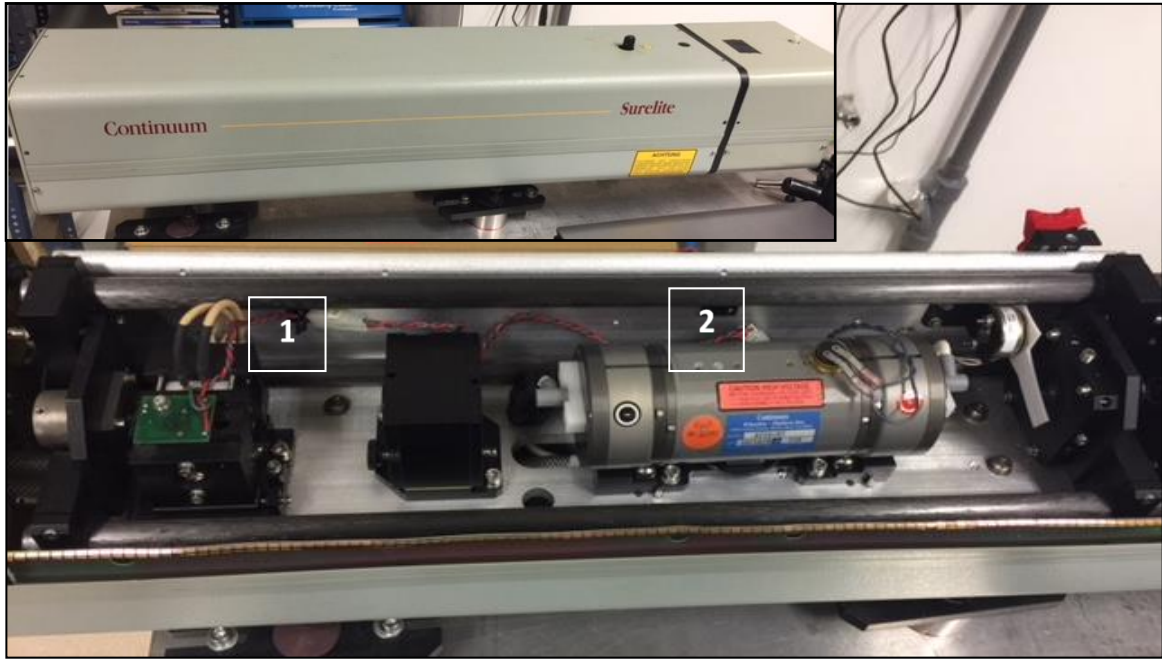
## 2.2 Descripción de los equipos usados

A lo largo de este apartado se describirán todos los prototipos usados en la memoria. Se comenzará describiendo el prototipo usado para llevar a cabo los análisis con el láser pulsado, para posteriormente presentar los equipos utilizados con las fuentes de láseres continuos.

### 2.2.1 Láser pulsado

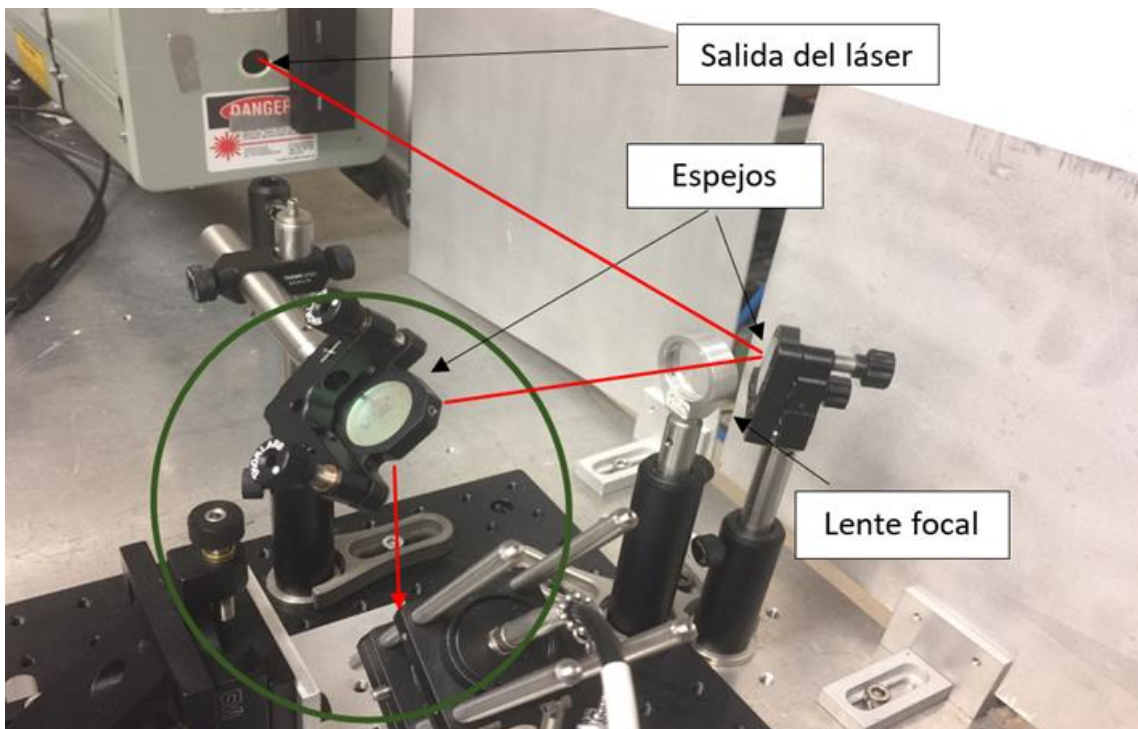
El equipo utilizado para llevar a cabo las medidas mediante espectroscopia de plasma inducido por láser (LIBS) consta de cuatro partes: 1) el propio láser (Nd:YAG) como fuente principal; 2) un sistema óptico, necesario para recoger la señal emitida por la muestra a analizar, que está formado por: dos lentes colimadoras de sílice fundida de 75 y 35 mm de distancia focal, una fibra óptica bifurcada UV-VIS con un núcleo de 400  $\mu\text{m}$  y dos espectrómetros que cubren un amplio espectro que va de 199 a 980 nm, 3) un ordenador para la recogida de los datos y el análisis de los espectros y 4) un generador de retardos necesario para sincronizar el pulso láser con la recogida de señal, para su posterior análisis.

El sistema láser de nanosegundos (Nd:YAG) usado en el proyecto, es de la firma Continuum Surelite, **figura 26**<sup>155</sup>. Dispone de un intervalo de frecuencias que varían de 1 a 10 Hz, con pulsos láser de una duración de 6 ns. Este láser utiliza la conmutación del factor Q activo (Q-switch), permitiendo una emisión de pulsos láser. El sistema de bombeo del láser se realiza mediante una lámpara de flash de Xe que opera entre los 800 y 820 nm, cuya línea fundamental de emisión se encuentra a una longitud de onda de 1.064 nm. Interponiendo en la línea óptica diferentes espejos no lineales, se puede llegar a diferentes longitudes de onda, consiguiendo el normal, primer, segundo y tercer armónico a 1.064 nm (660 mJ/pulso), 532 nm (310 mJ/pulso), 355 nm (160 mJ/pulso) y 266 nm (110 mJ/pulso), respectivamente.

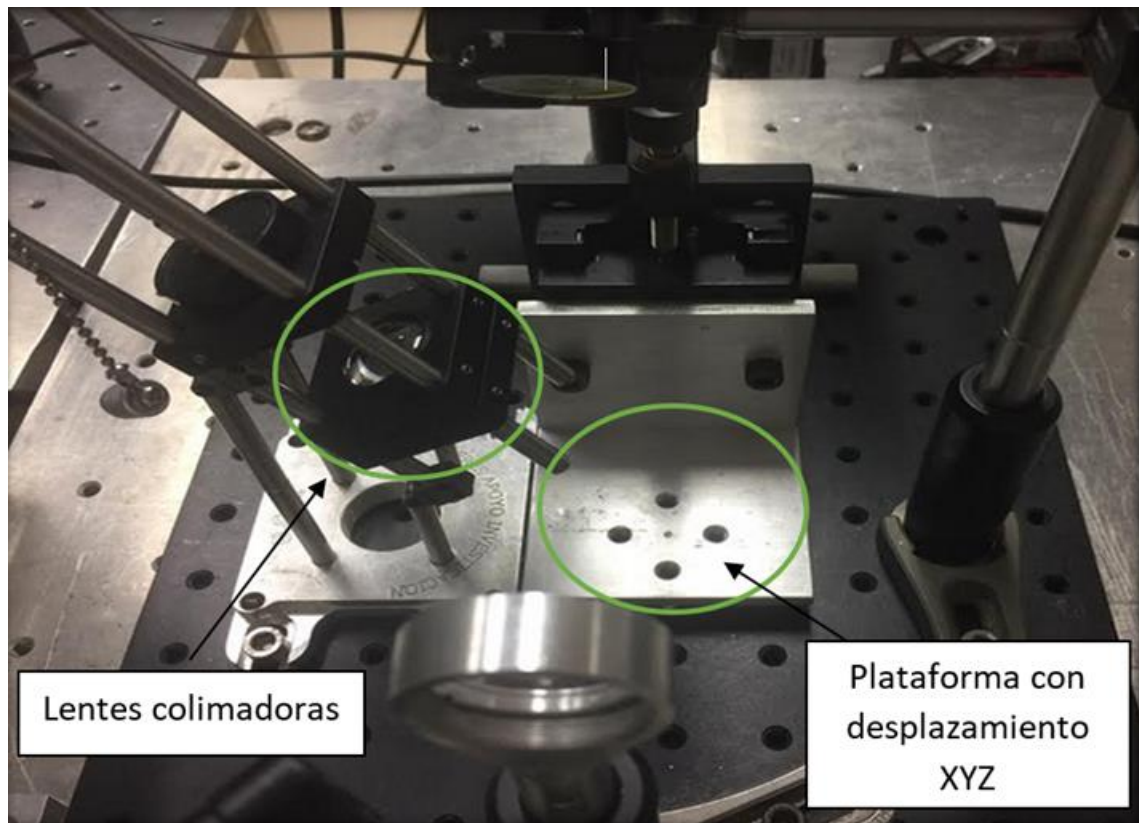


**Figura 26.** Láser de Nd:YAG. Interior del láser: 1: Q-switch. 2: cabeza del láser con la varilla y la lámpara de bombeo. En la esquina superior izquierda se muestra el sistema cerrado.

El sistema de montaje llevado a cabo en el laboratorio para realizar las medidas se muestra en las **figuras 27 y 28**.



**Figura 27.** Montaje experimental del láser pulsado (Nd:YAG).



**Figura 28.** Plataforma de adquisición de medidas.

Se trabajó a una longitud de onda de emisión de 1.064 nm y una frecuencia de 1 Hz. El haz láser era focalizado mediante una lente de 25 cm de distancia focal para posteriormente ser desviado 90 grados con la ayuda de un espejo. Las muestras se depositaban en una plataforma con desplazamiento XYZ para una mayor precisión de las medidas. La luz del plasma era recogida mediante dos lentes colimadoras, dispuestas con un ángulo aproximado de 45 grados con respecto a la normal. Dicha luz, era transportada mediante una fibra óptica bifurcada, hasta dos espectrómetros CCD (*“charge-coupled device”*, dispositivo de carga acoplada) de la casa BWTEK, que cubre un espectro desde longitudes de onda de 200 nm a 980 nm, con una resolución de 0,2 nm. Mediante un circuito electrónico, el láser era sincronizado con el espectrómetro, que junto con un generador de retardos (Standford Research System modelo DG-535) se ajustaba el tiempo entre el disparo del láser y la recogida de la información proporcionada por el plasma.

El generador digital de pulsos de retardo es un dispositivo utilizado para llevar a cabo la sincronización de distintos aparatos, en este caso, entre el disparo del láser y el espectrómetro, **figura 18**. Estos dispositivos, utilizan una referencia de tiempo

seleccionable asociada de manera automática a su disparador que facilita la sincronización entre equipos. Gracias a esta propiedad, la señal enviada del generador al espectrómetro se realiza con el tiempo de retardo introducido, permitiendo ajustar retardos desde segundos hasta picosegundos.

La señal recibida por los espectrómetros es enviada a un ordenador, donde se recoge el espectro correspondiente de la muestra a analizar. Las variables a tener en cuenta en las mediciones de las muestras son:

- **Tiempo de integración de las señales** recibidas por los espectrómetros. Se abarcaron tiempos comprendidos entre 1 ms y 100 ms.
- **Tiempo de detección.** El retardo entre el disparo del láser y la recogida de señal se modificaba gracias a la ayuda del generador de retardos para obtener una buena relación señal-ruido. Se probaron tiempos desde  $\mu$ s a ms.
- **Fluencia recibida por la muestra.** El espectro LIBS generado es proporcional a la energía láser aplicada a la muestra. Se realizaron análisis con energías comprendidas entre 100 y 360 mJ.
- **Ángulo de las lentes colimadoras.** El ángulo de las lentes colimadoras determinará la calidad de recepción de la señal proporcionada por el plasma. Se buscó la mejor posición con ángulos comprendidos entre 45 y 60 grados.
- **Lente focal.** La distancia focal de la lente (corta/larga) afecta directamente al tamaño de spot producido y a la densidad de potencia del haz del láser focalizado. Una lente de distancia focal corta produce un spot pequeño y una mayor densidad de potencia en la superficie de la muestra, obteniendo una mayor ablación. En contrapartida, un tamaño de spot muy pequeño puede afectar al valor de los resultados, perdiendo precisión por ejemplo en el análisis de muestras heterogéneas. Una lente con distancia focal larga genera un mayor tamaño de spot y un mayor volumen de plasma. A diferencia de las anteriores, la energía láser necesaria para producir la ablación del material es mayor<sup>156</sup>.

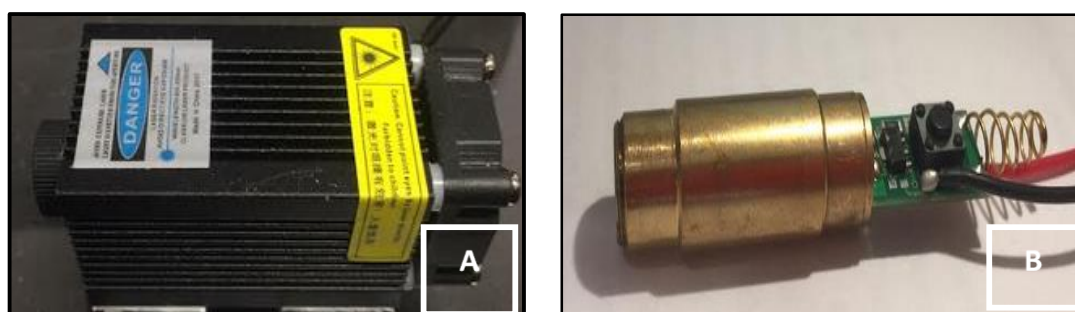
La distancia de la lente con respecto a la muestra es un parámetro a considerar ya que cualquier variación en la distancia (de unos pocos mm) afecta directamente a la intensidad de señal. Distintos estudios han mostrado que mediante la desfocalización del haz láser sobre la superficie de la muestra, se obtuvieron espectros LIBS con intensidad de señal

reproducible<sup>157</sup>, lo que a priori es una buena herramienta para el análisis de muestras heterogéneas. Esta desfocalización fue utilizada por dos razones: 1) evitar posibles derrames de las muestras a analizar y 2) evitar que pequeñas variaciones de la distancia focal (mm) afecten de manera acusada a la intensidad de señal.

### 2.2.2 Láser continuo

Una vez descrita la instalación basada en el láser pulsado, se pasa a describir el equipo de láser continuo. El láser continuo empleado está basado en diodos láser (*vide supra*). Los diodos láser, a diferencia de los láseres pulsados, presentan las ventajas de tener un reducido volumen y peso, con un consumo de energía menor. Como contrapartida a estas ventajas, se debe de mencionar que los niveles absolutos de potencia que permiten alcanzar son menores y no los hacen aptos para aplicaciones industriales avanzadas, tales como corte, soldadura, etc.

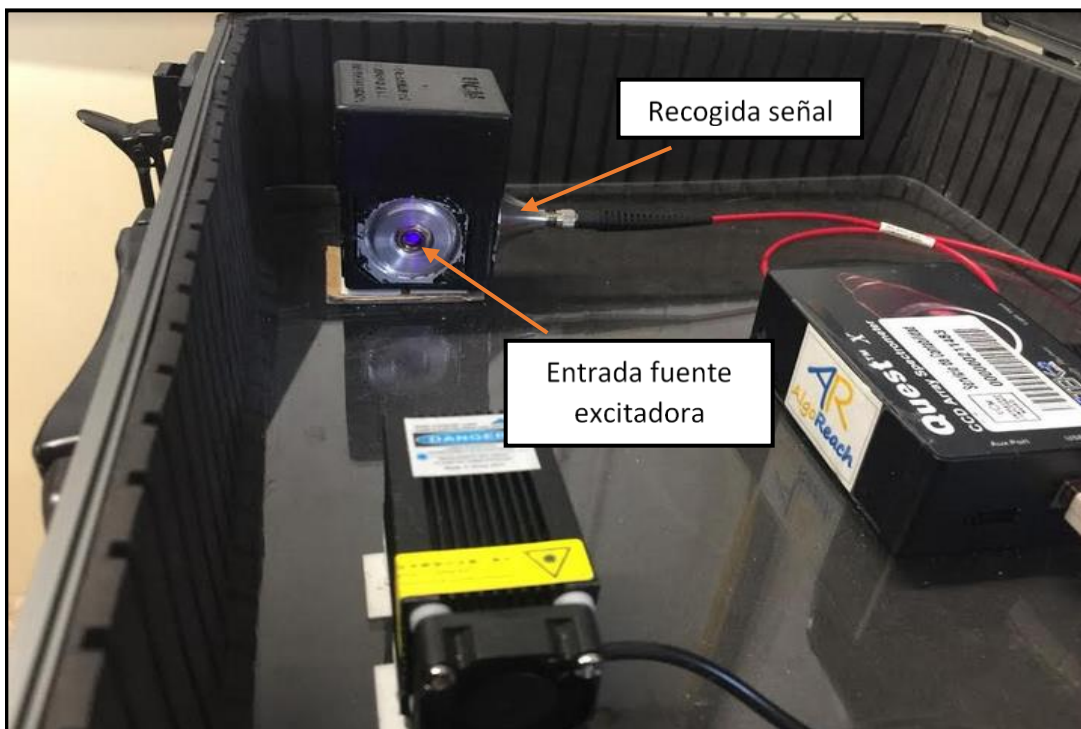
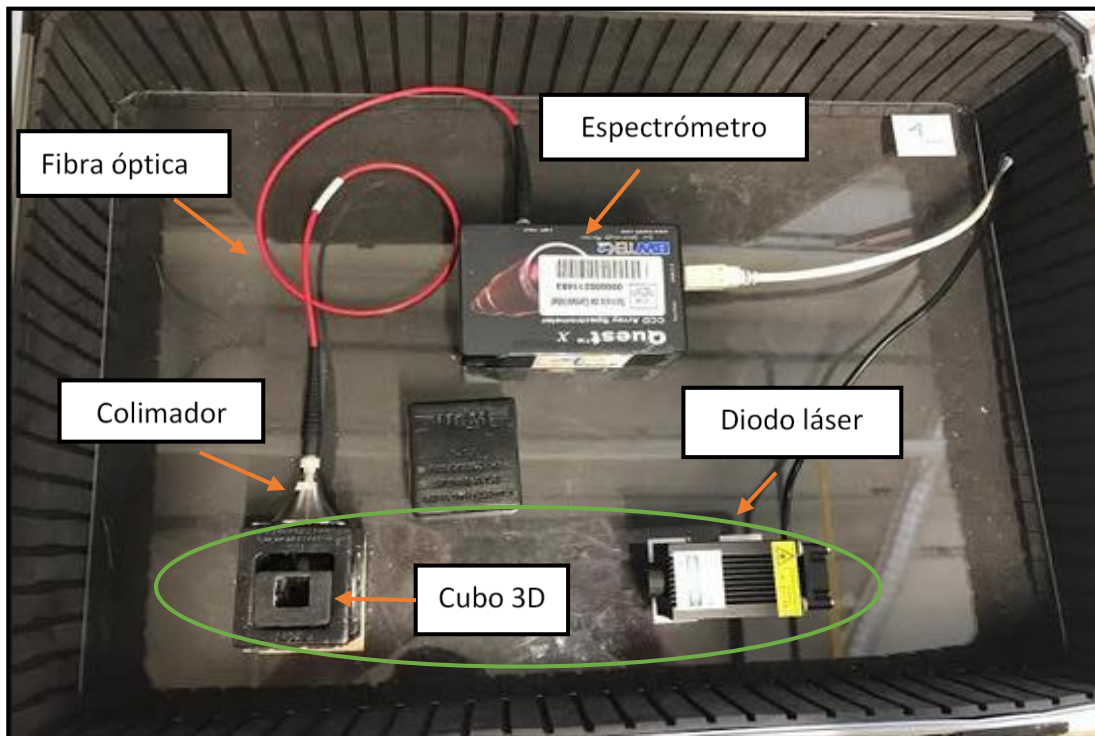
En lo que se refiere al sistema experimental llevado a cabo con diodo láser en esta memoria, se utilizaron dos diodos láser con diferentes longitudes de onda: 405 (diodo UV) y 532 nm (diodo verde), **figura 29**. En cuanto a las potencias de estos diodos láser, serían de 500 mW y 10 mW, respectivamente.



**Figura 29.** Láseres utilizados en la experimentación: diodo láser UV (A) y verde (B).

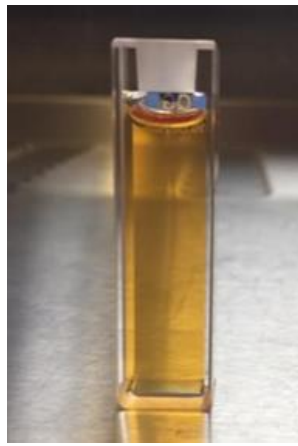
Todas las medidas se realizaron dentro de un maletín de dimensiones de 46 x 33 x 16 cm concebido para su fácil transporte y posterior análisis de muestras *in situ*. En su interior encontramos, **figura 30**: un espectrómetro que mide longitudes de onda de 350 a 1.050 nm con una resolución de 1,87 nm, una fibra óptica con un núcleo de 200 micras, un colimador (que recoge la señal procedente de la muestra) y un cubo hecho por impresora 3D (Replicator Z18, MakerBot Industries) realizado en los talleres del CAI (Centros de Asistencia a la Investigación) de la Facultad de Físicas (UCM). Por último, y no menos

importante, la fuente de excitación, es decir, los diodos láser de diferentes longitudes de onda antes mencionados.



**Figura 30.** Interior del maletín que contiene el sistema basado en diodo láser.

A diferencia de la instalación del láser pulsado, la muestra es introducida en una cubeta de cuarzo (material adecuado para medidas de fluorescencia), con un paso óptico de 1 cm, **figura 31**. Una vez introducida la cubeta dentro del cubo, un diodo laser continuo incide sobre la misma para excitarla. La fluorescencia emitida, producto de la emisión de las moléculas fluorescentes de la muestra, es recogida por un colimador dispuesto a 90 grados respecto a la fuente excitadora. Luego, esta emisión es transportada hasta el espectrómetro gracias a la fibra óptica. Este último hace llegar los espectros de fluorescencia al ordenador donde serán estudiados.



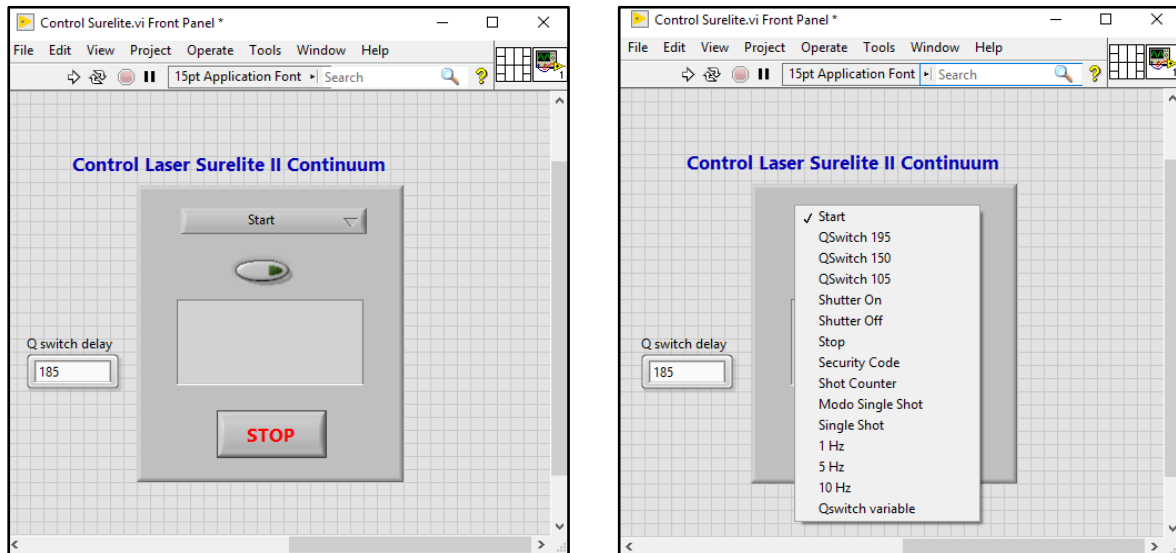
**Figura 31.** Cubeta de cuarzo con una muestra de miel en su interior.

A la hora de realizar las diferentes medidas, se optimaron varios parámetros que tenían una influencia notable en las medidas a realizar, como son:

- **Tiempo de exposición de la muestra** a la radiación procedente del diodo láser.
- **Tiempo de integración** para tener una buena relación señal/ruido.
- **Diodo láser** idóneo para la experimentación.

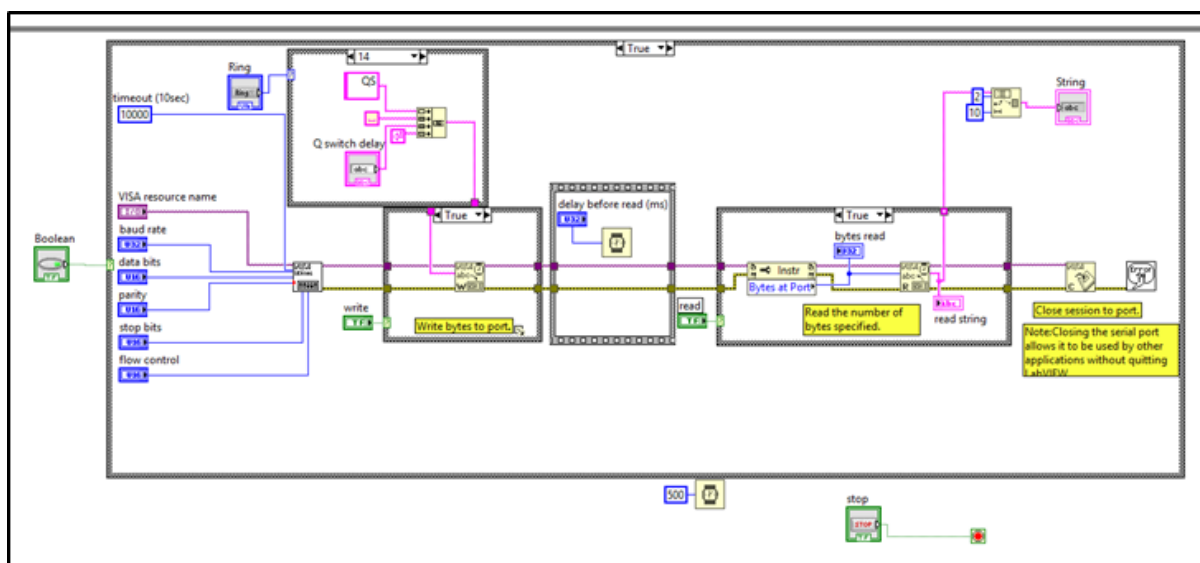
## 2.3 LabVIEW

A la hora de manejar el láser de Nd:YAG, se utilizó un código realizado con el software LabVIEW (en las **figuras 32 y 33** se pueden ver dos capturas de pantalla de este software) que permite poder variar la frecuencia de disparo, la energía del láser o el modo de disparo entre otros parámetros de medida.



**Figura 32.** Panel frontal que permite configurar el láser.

Gracias al código, se pudo llevar un ajuste de manera remota de los parámetros óptimos del láser a la hora de realizar las medidas. Con este tipo de software el usuario puede controlar de manera remota el láser, facilitando el manejo y control de la experimentación.



**Figura 33.** Diagrama de bloques con el código fuente.



**RESULTADOS**



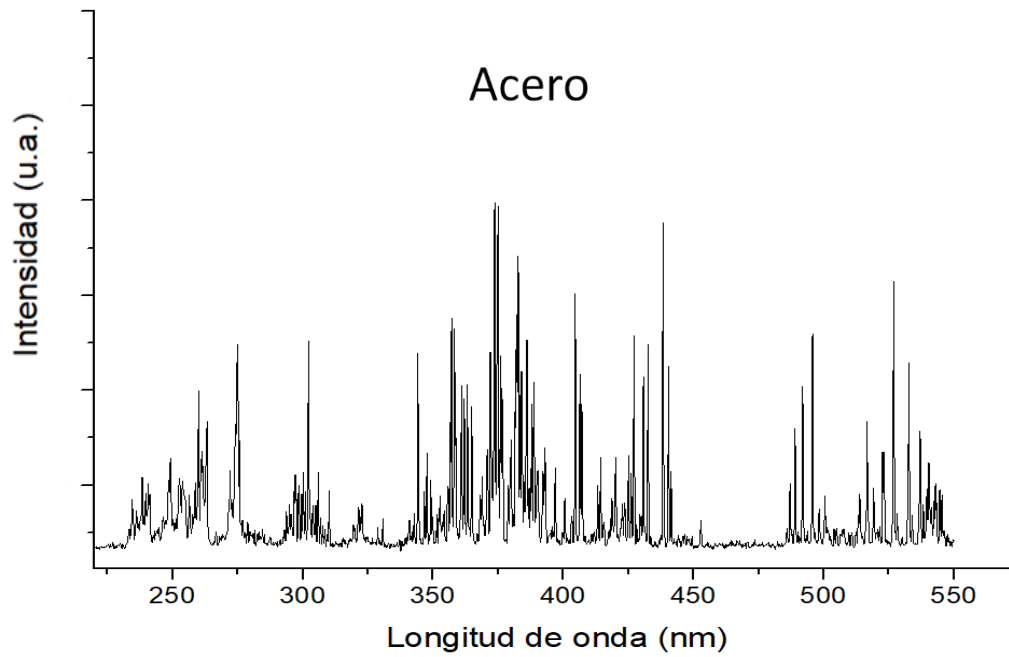
### 3. Resultados

A continuación, se muestran los resultados obtenidos en los diferentes grupos de experimentos llevados a cabo con los láseres pulsados y continuos, así como la puesta a punto de cada equipo.

#### 3.1 Láser pulsado

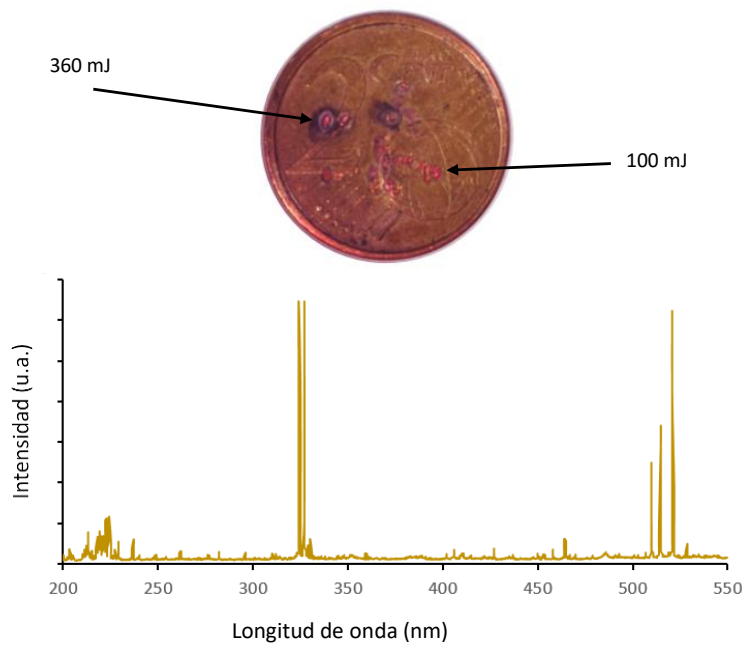
En este apartado se pretende mostrar el diseño y optimización del equipo de análisis basado en láser pulsado, más concretamente, LIBS. Este equipo será aplicado y validado para productos alimentarios como la miel.

Para poder llegar a tener unas medidas representativas de LIBS, se hicieron numerosas pruebas con diferentes montajes del láser. Primero se probó un prisma como elemento que desviase el haz láser hacia la muestra y se comparó con un espejo, viendo que este era más efectivo al poder graduar la inclinación con mayor precisión. Luego se probaron dos métodos de recogida de señal, uno de ellos compuesto por un colimador de unos pocos cm y el otro formado por dos lentes colimadoras. Se observó que las lentes recogían más señal y eran más sensibles. Por último se testó la distancia e inclinación de las lentes colimadoras, viendo que a un ángulo de unos  $45^\circ$  y a una distancia de 7 cm de la muestra, se obtenían los mejores resultados. Para llegar a estas conclusiones se usó con una placa de acero donde se probaban aspectos como el ángulo de las lentes colimadoras, el tiempo de retardo necesario para obtener una buena señal, el tiempo de integración óptimo y la energía necesaria para conseguir ablaciones sobre la muestra. Se escogió una placa de acero para averiguar si la señal (**figura 34**) que se obtenía se correspondía con datos bibliográficos, además de ser el material más sencillo de analizar con esta herramienta.



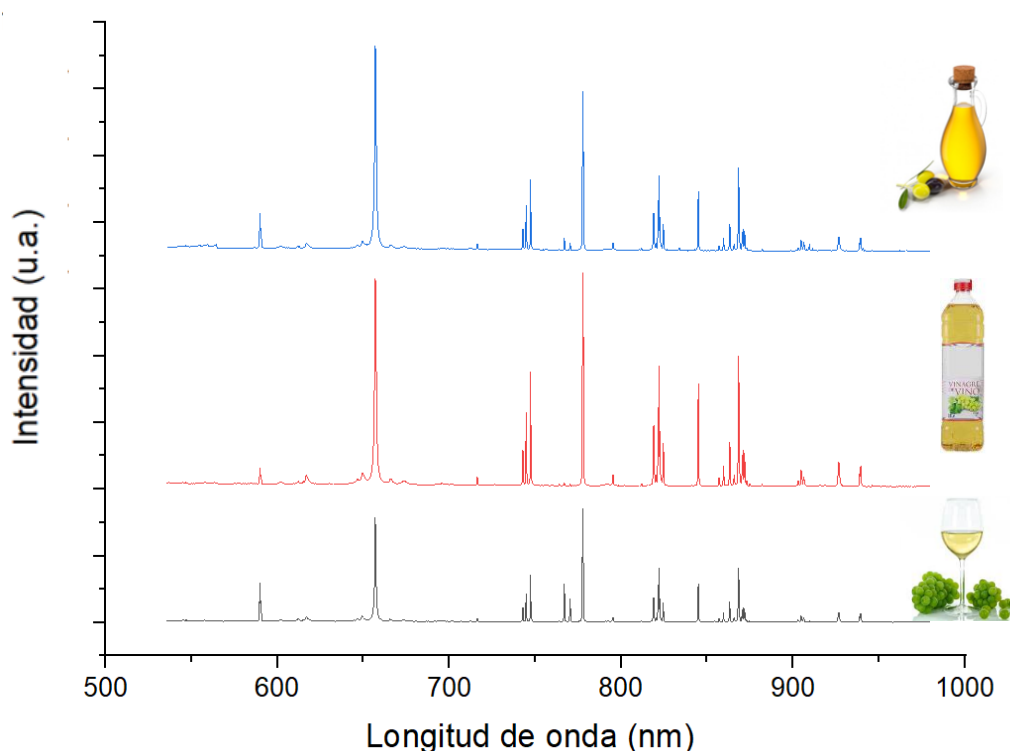
**Figura 34.** Espectro de emisión (LIBS; intensidad (unidades arbitrarias; u.a.) frente a longitud de onda; nm) correspondiente a una placa de acero.

Además del acero, también se hicieron pruebas con monedas de 2 céntimos de euro para comprobar que el espectro que arrojaba era distinto al anterior y para observar que las “huellas” del láser eran diferentes a distintas energías (**figura 35**).



**Figura 35.** Ablaciones láser en una moneda de 2 céntimos y su correspondiente espectro LIBS.

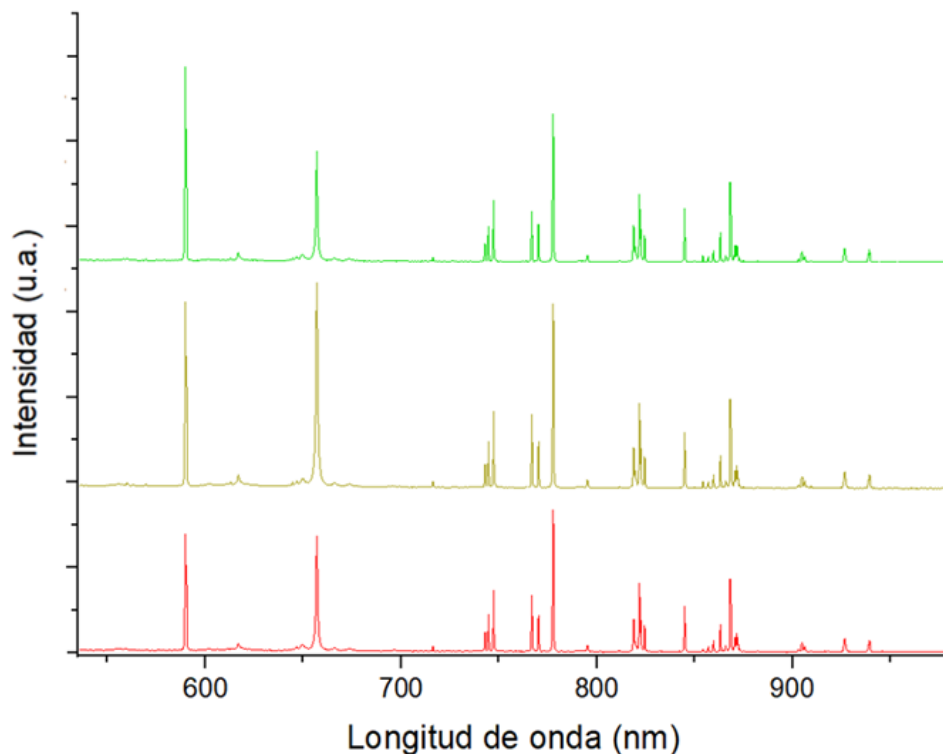
Una vez realizadas las comprobaciones con metales, se pasaron a analizar diferentes muestras, haciendo un recorrido desde el control de calidad de los alimentos sólidos hasta los líquidos. Se analizaron muestras de pescado, miel, aceite, vino y vinagre. La dificultad a la hora de medir radicaba en la consistencia de las muestras, es decir, para las muestras líquidas (vino, vinagre y aceite) cada pulso láser suponía una proyección hacia el exterior del recipiente que las contenía, perdiendo reproducibilidad en la medida. Para hacer frente a esta dificultad, se realizaron las medidas con muestras congeladas. Algunos ejemplos de los espectros obtenidos se muestran en la **figura 36**.



**Figura 36.** Espectros LIBS correspondientes al AOVE, vinagre y vino.

A pesar de medir las muestras congeladas, no se podían hacer más de tres disparos seguidos sin que hubiese una transición de fase acompañada de una disminución de la señal, provocado por la alta temperatura generada por el haz incidente.

En lo que respecta al pescado y la miel, se apreció una mayor estabilidad en las medidas a causa de su mayor consistencia. Las medidas realizadas con las piezas de pescado se congelaron y descongelaron varias veces para ver si había diferencias significativas entre el pescado fresco recién congelado y la pieza degradada (también congelada), **figura 37**.



**Figura 37.** Espectros comparativos entre pescado fresco (verde), calentado 2 horas a 25°C (amarillo) y la pieza degradada (rojo).

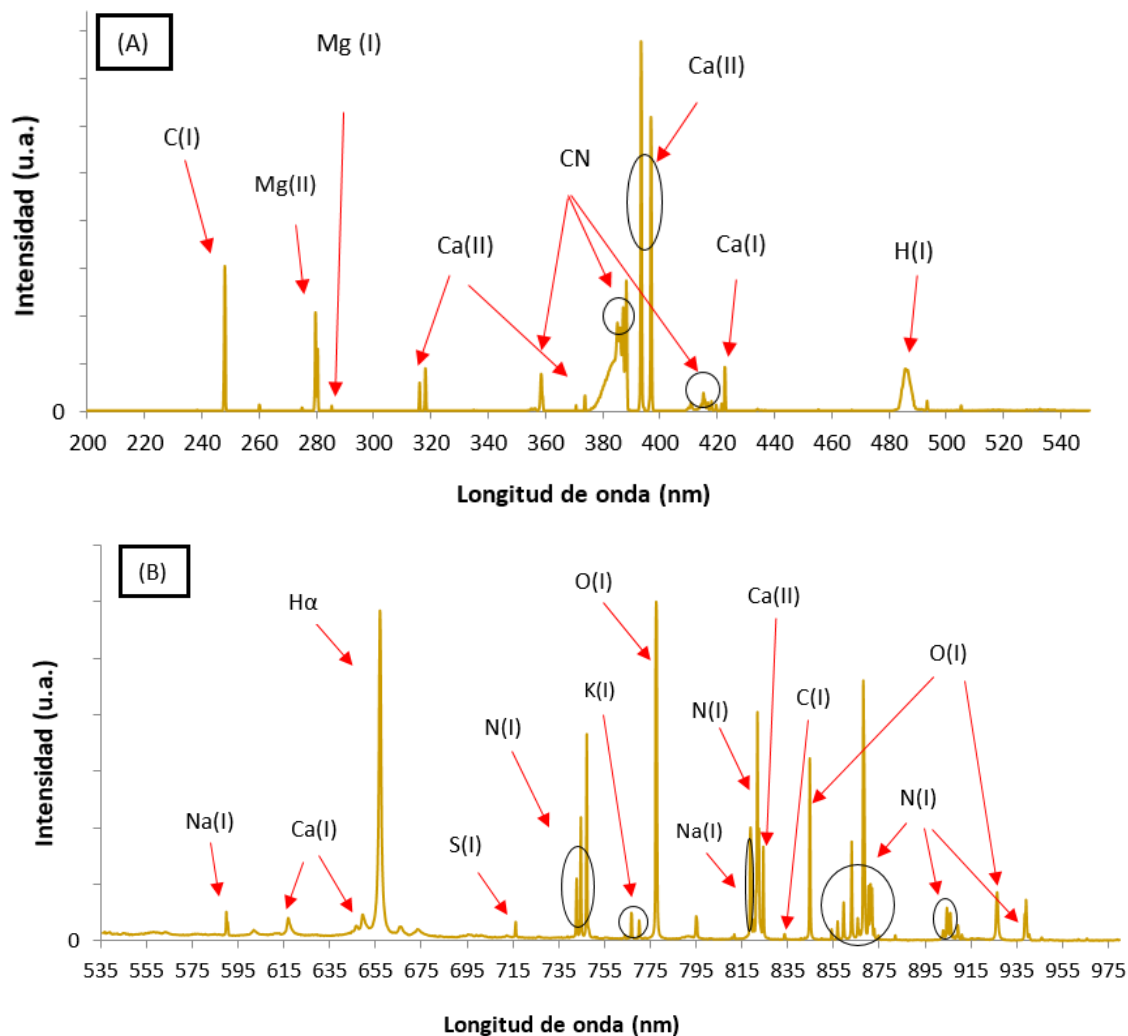
Como se puede apreciar en la **figura 36** los espectros LIBS difieren según el tipo de alimento analizado, mostrando señales e intensidades ligeramente diferentes. En la **figura 37** se aprecia una disminución de la intensidad de señal que parece estar relacionada con la frescura del alimento. A la luz de estos resultados es esperable que esta técnica permita caracterizar distintos tipos de alimentos pertenecientes a clases en concreto, como es el caso de las mieles, que se describe a continuación.

### 3.1.1 Clasificación y detección de adulteraciones en la miel

La miel es un alimento con grandes propiedades beneficiosas para la salud. Contiene antioxidantes, vitaminas y numerosos minerales. Estos beneficios muchas veces se ven empañados por un mal tratamiento de la miel en el proceso de producción o una posible adulteración (intencionada o no) que perjudica la calidad final del producto. Dado que la miel se encuentra entre los diez alimentos con mayor índice de adulteración de la Unión Europea, se hace necesaria una herramienta que pueda autenticar el tipo de miel según el origen botánico y geográfico que proteja a los apicultores y productores de las malas artes y actividades fraudulentas.

La combinación de la espectroscopia de descomposición inducida por láser (LIBS) y los parámetros caóticos se han empleado para clasificar seis mieles europeas de diferentes orígenes botánicos (naranja, castaño, eucalipto, multifloral, romero y limón), así como para detectar muestras adulteradas con sirope arroz en concentraciones de peso tan bajas como el 2 %. Se escogió este adulterante por ser uno de los más comunes y más difíciles de localizar en estas actividades fraudulentas<sup>148</sup>. Uno de los objetivos de este apartado es detectar las diferencias entre muestras con o sin adulterante.

Las muestras fueron analizadas por un láser de estado sólido (Nd:YAG) a una frecuencia de 1 Hz y una longitud de onda de emisión de 1.064 nm. Todas las medidas se realizaron en condiciones normales de presión y temperatura. Cada miel fue analizada a una energía de 270 mJ con un tiempo de integración de 1 ms y 4 ns de retardo entre el pulso del láser y la recogida de datos (*vide supra*). Las muestras (5 ml) eran depositadas en un recipiente cilíndrico de 2.1 cm de diámetro y 1 cm de altura. El recipiente que contiene la muestra se coloca en una plataforma micrométrica con desplazamiento XYZ (PT3, Thorlabs), donde se analizan 13 puntos distribuidos uniformemente en la superficie de la muestra. De cada miel analizada fueron obtenidas una media de 39 (13x3) espectros por muestra. Para obtener datos representativos de cada una de las muestras, las medidas fueron realizadas por triplicado. En resumen, se obtuvieron 78 muestras espectrales de las mieles puras (6 mieles x 13 medidas por miel). La información era recogida mediante dos lentes colimadoras dispuestas con un ángulo aproximado de 45 grados respecto a la normal. La señal era transportada mediante una fibra óptica bifurcada hasta dos espectrómetros, cubriendo un amplio espectro entre 200 y 980 nm. Esta información ha sido utilizada para el cálculo de los parámetros caóticos (*vide infra*). Los espectros LIBS obtenidos fueron analizados mediante la base de datos LIBS versión 5.6 del NIST (*“National Institute of Standards and Technology”*), que ha sido utilizada para identificar las líneas de emisión de los diferentes átomos presentes en la muestra. Antes de llevar a cabo la comparación de los espectros de las diferentes mieles, se analizaron los resultados de cada espectrómetro por separado, **figura 38**.



**Figura 38.** Espectro de emisión correspondiente a la miel de eucalipto para el espectrómetro con una ventana de 200 a 550 nm (A) y de 535 a 980 nm (B). Los picos se asignan a su elemento o molécula correspondiente. (I) indica átomos neutros mientras que (II) son átomos ionizados.

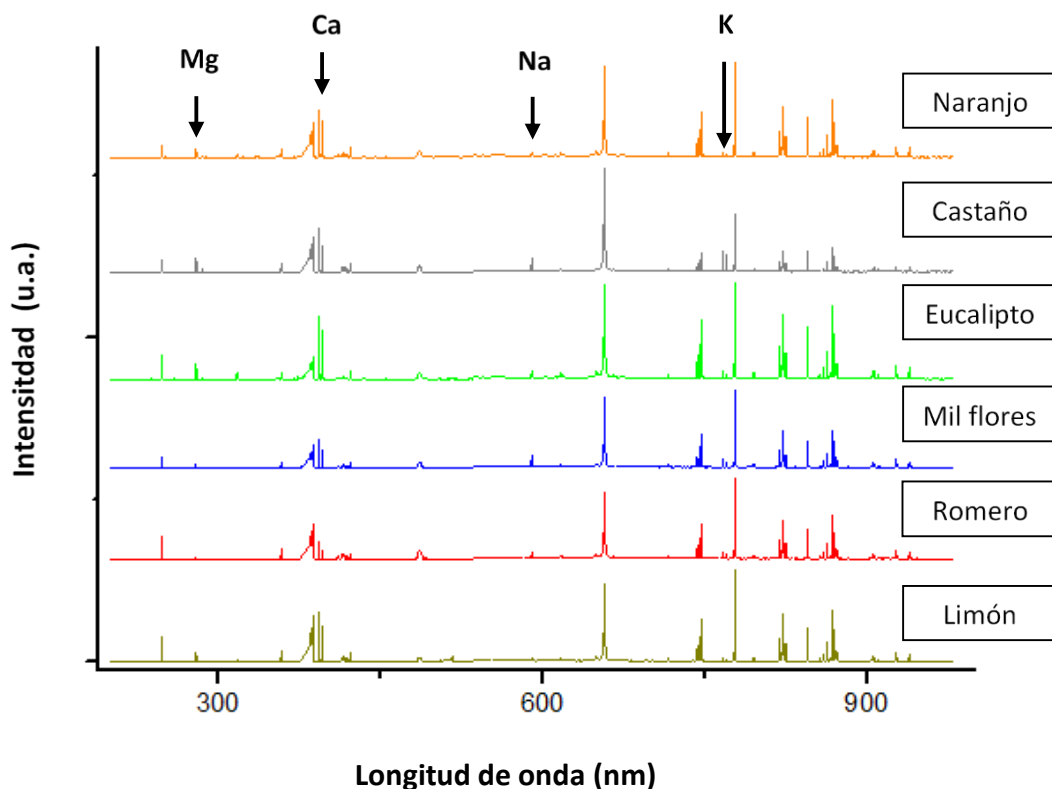
El plasma producido por la ablación de la muestra proporciona información sobre las especies atómicas, iónicas y moleculares resultantes de la composición de la muestra de miel y de la excitación de la atmósfera que rodea a la muestra (aire en este caso). Las líneas debidas a los compuestos orgánicos son las correspondientes a C, H y O. Gracias a las relaciones entre ellos, es decir, C/H, C/O y C/N, se pueden identificar compuestos orgánicos tales como compuestos nitro aromáticos o moléculas como el antraceno (ejemplos no encontrados en la miel)<sup>158</sup>. Las bandas de emisión de moléculas que contienen C<sub>2</sub> (sistema Swan) están relacionadas con la presencia de anillos aromáticos en compuestos orgánicos<sup>159</sup>, mientras que las bandas CN (sistema violeta) se deben a la

interacción del carbono con el nitrógeno atmosférico<sup>160</sup>. Los principales metales presentes en las muestras de las mieles analizadas son los siguientes metales alcalinos y alcalinotérreos: Ca, Na, K y Mg. La concentración de estos metales en varias mieles analizadas por González-Miret y col. (2005) se muestra en la **tabla 8**.

**Tabla 8.** Cantidad de metales (mg/kg) encontrados en las mieles analizadas<sup>161</sup>. Las cantidades más altas están marcadas en negrita.

Origen botánico de la miel	Na	K	Ca	Mg
Cítricos	83.9	237.0	50.7	10.9
Romero	80.8	274.8	47.5	14.3
Eucalipto	<b>144.4</b>	476.7	90.2	29.1
Castaño	93.9	<b>1090.1</b>	<b>102.5</b>	<b>76.0</b>

Estos datos servirán de referencia para comparar las mieles según su origen botánico. Los principales picos de emisión de Ca, Na, K y Mg se encuentran entre las longitudes de onda 393-396 nm, 589-590 nm, 767-770 nm y 279-280 nm, respectivamente (**figura 38**). Debe tenerse en cuenta que el Ca también muestra un pico de alrededor de 320 nm, pero sólo se considera el que está entre 393 y 396 nm, ya que es mucho más relevante desde el punto de vista estadístico. Para comprobar si existen diferencias reales cuantificables en cuanto a estos metales en las mieles analizadas, se realizó un estudio comparativo de los espectros de emisión de LIBS (**figura 39**).



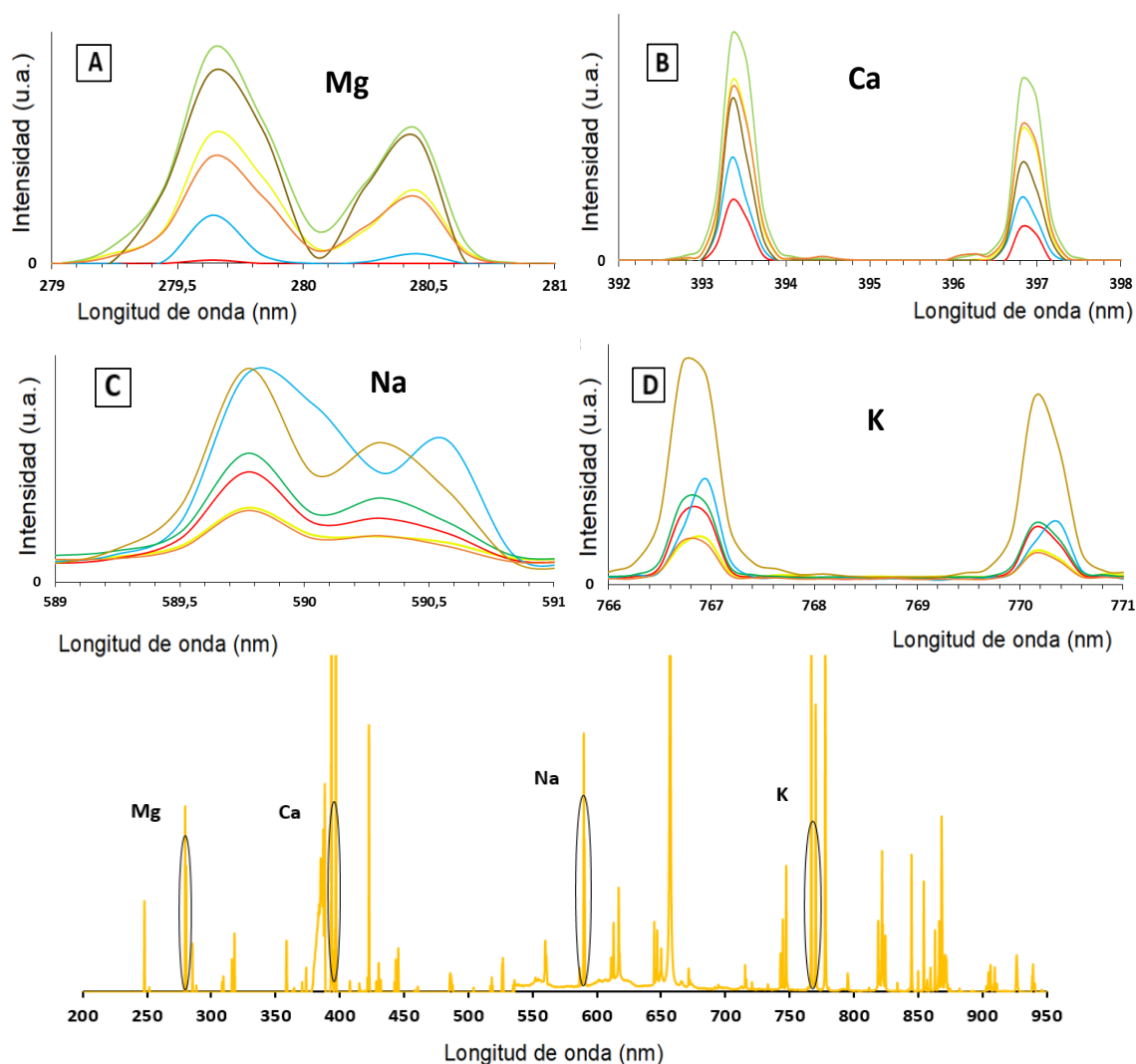
**Figura 39.** Espectros LIBS de las mieles puras analizadas de diferentes orígenes botánicos. Las posiciones de los metales considerados están marcadas (Ca, Na, K y Mg).

La **Figura 39** muestra las diferencias en la intensidad de emisión, concretamente en las líneas correspondientes a los metales mencionados presentes en las mieles. El porcentaje de metales que se encuentran en la miel está relacionado con su color, ya que su concentración está correlacionada con los colores más oscuros de la miel<sup>162</sup>. Sabiendo esto, es de esperar que las mieles con mayor contenido en metales sean de castaño, eucalipto y multifloral, ya que aparentemente parecen más oscuras a simple vista que las mieles de romero, naranja y limón (**figura 40**).



**Figura 40.** Origen de la miel de izquierda a derecha: naranja, castaño, eucalipto, multifloral, romero y limón.

Para comprobar si la secuencia de colores mostrada en la **figura 40** también se corresponde con el contenido de los cuatro metales descritos, se han comparado los espectros de emisión LIBS de las mieles analizadas. Las bandas de emisión LIBS de Ca, Na, K y Mg de las seis mieles puras están representadas en la **figura 41**.

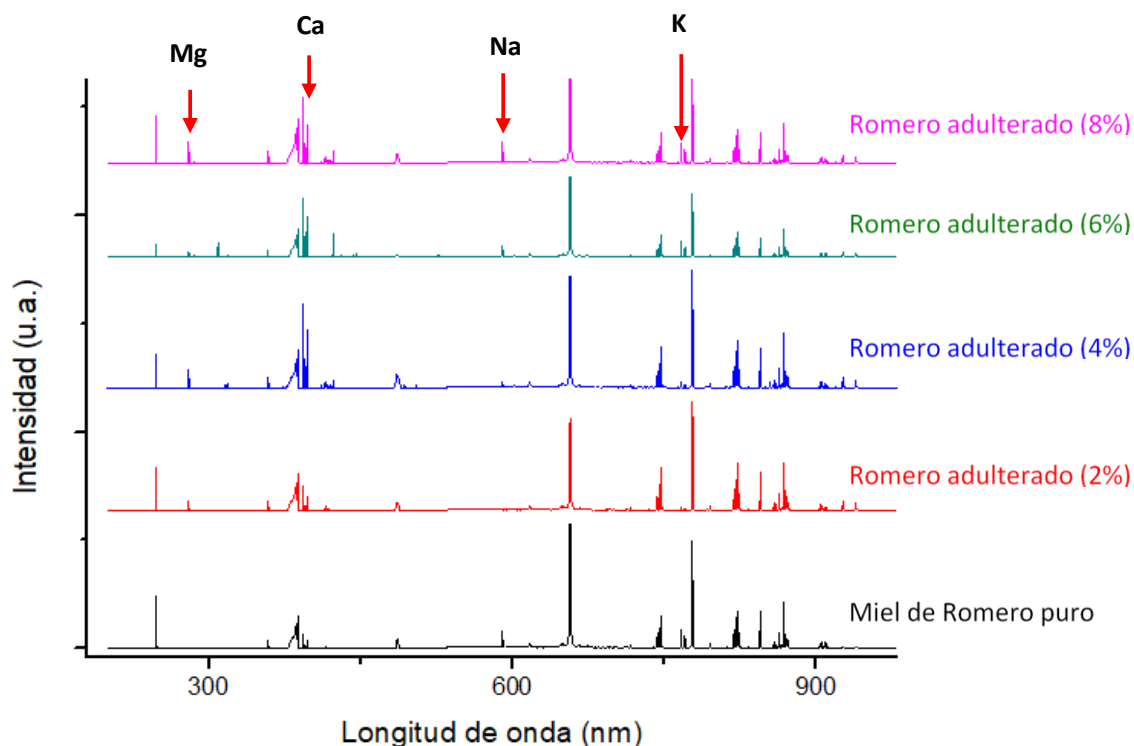


**Figura 41.** Bandas de emisión LIBS ampliadas de (a) Mg, (b) Ca, (c) Na y (d) K en las mieles. Los colores de las líneas corresponden a mieles puras de diferentes orígenes botánicos: limón (amarillo), castaño (marrón), romero (rojo), multifloral (azul), eucalipto (verde) y naranja (naranja). El gráfico inferior es un ejemplo arbitrario de un espectro LIBS de la miel para mostrar dónde se encuentran las regiones amplificadas (a-d).

En la **figura 41** se puede observar que, en general, la miel de origen multifloral, eucalipto y castaño poseen un mayor contenido de metales, lo que concuerda con la hipótesis mencionada basada en el color (**tabla 6; figura 40**)<sup>161,162</sup>. Específicamente, la miel de eucalipto tiene el mayor contenido de Ca y Mg, la miel multifloral revela las mayores

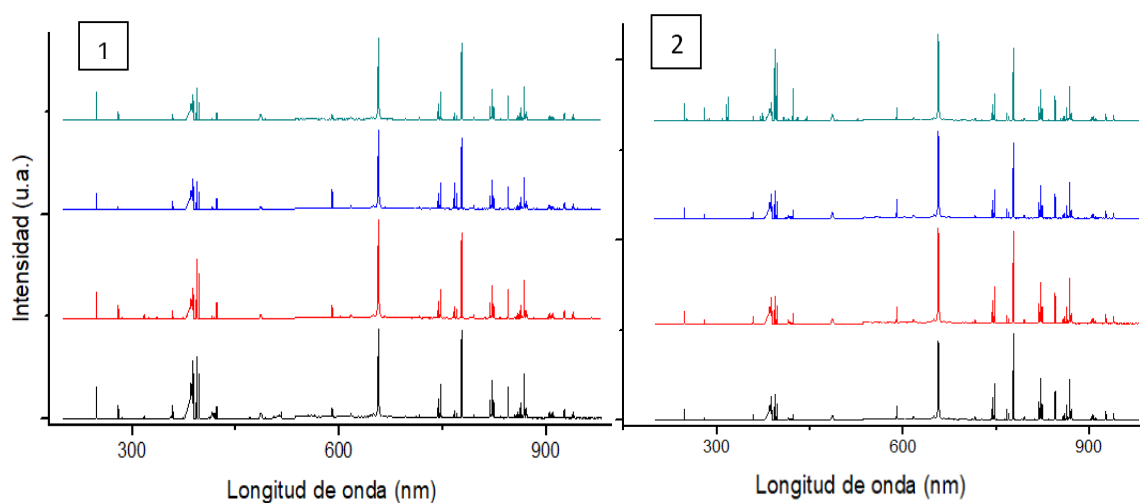
cantidades de Na (muy cerca del castaño), y el castaño posee la mayor cantidad de K. Por otro lado, como era de esperar, existe una notable similitud entre los perfiles LIBS de las mieles de limón y de naranja. Esto puede atribuirse a su origen botánico similar (ambas mieles provienen de abejas que sólo recogen néctar de las flores de los cítricos). Por último, las mieles de cítricos y romero tienen el menor contenido en metales, así como los matices de color más claros. Estos hechos son consistentes con otros estudios similares publicados anteriormente que involucran análisis de miel<sup>163,164,165</sup>. Sin embargo, en cada uno de estos estudios, las concentraciones no eran exactamente las mismas debido a los diferentes orígenes geográficos (propiedades de los suelos, clima, etc.) de las mieles, que afectan directamente a su contenido metálico resultante. Con todo esto, se puede decir que existen diferencias entre mieles puras de diferentes orígenes botánicos, y que pueden ser identificadas con éxito a través de LIBS (**figura 41**).

El siguiente paso es el análisis de la adulteración de las mieles puras con porcentajes crecientes de sirope de arroz como adulterante. Para llevar a cabo esta parte, se seleccionaron tres de las seis mieles estudiadas como representación del total: miel de romero, miel de limón y miel multifloral. Al igual que en las medidas realizadas con las mieles puras, se hizo a una energía de 270 mJ, manteniendo el tiempo de integración y de retardo (1 ms y 4ns, respectivamente). Considerando las mismas bandas de emisión de LIBS para las longitudes de onda determinadas y mostradas en las **figuras 38** y **39**, la presencia de los cuatro metales característicos (Ca, Na, K y Mg) también podían ser detectados en mieles adulteradas con sirope de arroz. La **figura 42**, muestra los diferentes perfiles de emisión de LIBS para la miel de romero pura adulterada con sirope en un 2, 4, 6 y 8 % en peso.



**Figura 42.** Espectros de emisión LIBS de miel pura y de romero adulterado con sirope de arroz a diferentes concentraciones. Se muestran las posiciones de Ca, Na, K y Mg.

Mirando las bandas de emisión generadas por estos cuatro metales, no parecen diferir visiblemente en el espectro LIBS de las muestras de miel de romero con cantidades variables de sirope de arroz (**figura 42**). Lo mismo puede decirse tanto de las mieles de limón como de las mieles multiflorales, **figura 43**.



**Figura 43.** Espectros de emisión de miel de limón (1) y miel multifloral (2). Las gráficas estarían representadas por miel pura (—), adulterada en un 2 % (—), 4 % (—) y 6 % (—).

Como era de esperar, este hecho tiene sentido, ya que las concentraciones de adulterantes en todos los casos son muy bajas y similares (siempre igual o menor a 8 % en peso). Por lo tanto, para clasificar las muestras de miel pura y adulterada, se han analizado los perfiles completos de los espectros de emisión LIBS con el fin de utilizar toda la información disponible que se pueda extraer de ellos.

En relación con la clasificación de las muestras adulteradas o no, se utilizó el mismo procedimiento que en las muestras puras, con lo que se obtuvieron 156 espectros LIBS (3 mieles x 4 concentraciones de adulterante x 13 medidas por muestra). Estos datos compuestos por vectores de dos dimensiones (intensidad de emisión LIBS frente a longitud de onda) se utilizarán para el cálculo de parámetros caóticos (*vide infra*).

### Tratamiento matemático

Para poder clasificar y detectar adulteraciones en mieles con diferentes orígenes botánicos, se calcularon parámetros caóticos basados en un conjunto de coeficientes de autocorrelación lag-K para todo el espectro LIBS (199.99 a 980.06 nm)<sup>166</sup>. La autocorrelación espectral o coeficiente de autocorrelación lag-k ( $S_{\Delta\lambda}$ ), es también conocido como función de correlación en serie.  $S_{\Delta\lambda}$  es un coeficiente que cuantifica el grado en que  $X_\lambda$  versus  $X_{\lambda-k}$  (en este caso, X) representa la emisión fluorescente de la muestra a una longitud de onda ( $\lambda$ ) y k significa el retraso en unidades de longitud de onda. Este parámetro mide linealmente la intensidad con la que cada punto de un dato depende del retardo en la longitud de onda ( $\Delta\lambda$ ). En otras palabras, es la relación entre la autocovarianza y la varianza de los datos espectrales. Para un espectro dado,  $S_{\Delta\lambda}$  está entre 1 ( $\Delta\lambda = 0$ ) y 0 ( $\Delta\lambda$  grande)<sup>167</sup>. El coeficiente de autocorrelación lag-k ( $S_{\Delta\lambda}$ )<sup>77</sup> está descrito según la **ecuación 3**<sup>168</sup>:

$$S_{\Delta\lambda} = \frac{\sum_{n=1}^{N-\Delta\lambda} (X_n - \bar{X}) \cdot (X_{n-\Delta\lambda} - \bar{X})}{\sqrt{\sum_{n=1}^{N-\Delta\lambda} (X_n - \bar{X}) \cdot \sum_{n=1}^{N-\Delta\lambda} (X_{n-\Delta\lambda} - \bar{X})}} \quad (3)$$

En esta ecuación, N representa el número de puntos de emisión para un espectro dado. Teniendo en cuenta que el valor de  $\lambda$  oscila entre 199.99 y 980.06 nm, con pasos de longitud de onda igual a 20, se han obtenido 178 parámetros de autocorrelación. Estos parámetros caóticos se utilizarán para diseñar, optimizar y validar modelos lineales (*vide infra*). En resumen, dado que se diseñaron modelos para la clasificación de los espectros

LIBS en función del tipo de miel y si estas mieles presentan alguna adulteración, las variables de entrada y salida son los parámetros caóticos (PCs) y la clasificación correspondiente a la clase, respectivamente.

En este trabajo, los PCs fueron calculados a través del software Microsoft Excel 2013. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo por medio del software de MATLAB 2018a y Statgraphics Centurion XVIII. Una vez que se construyó la base de datos totales, en cada uno de los casos se dividieron aleatoriamente en dos grupos formados por datos que se utilizarán en el proceso de aprendizaje y posterior verificación. Estos conjuntos contienen alrededor del 80 % y el 20 % de la base de datos global, respectivamente. Las concentraciones de los adulterantes en el conjunto de verificación deben estar dentro del rango del conjunto de datos de aprendizaje <sup>169</sup>. Los valores de PCs se calcularon utilizando los espectros LIBS y por medio de la **ecuación 3**. Cada conjunto de datos (o mezcla binaria) está compuesto por 178 PCs y 4 valores de concentración de adulterantes (0 a 8 % en peso). En total, como se ha mencionado anteriormente, se cuenta con una base de mieles puras y adulteradas formada por 234 espectros LIBS (78 y 156, respectivamente).

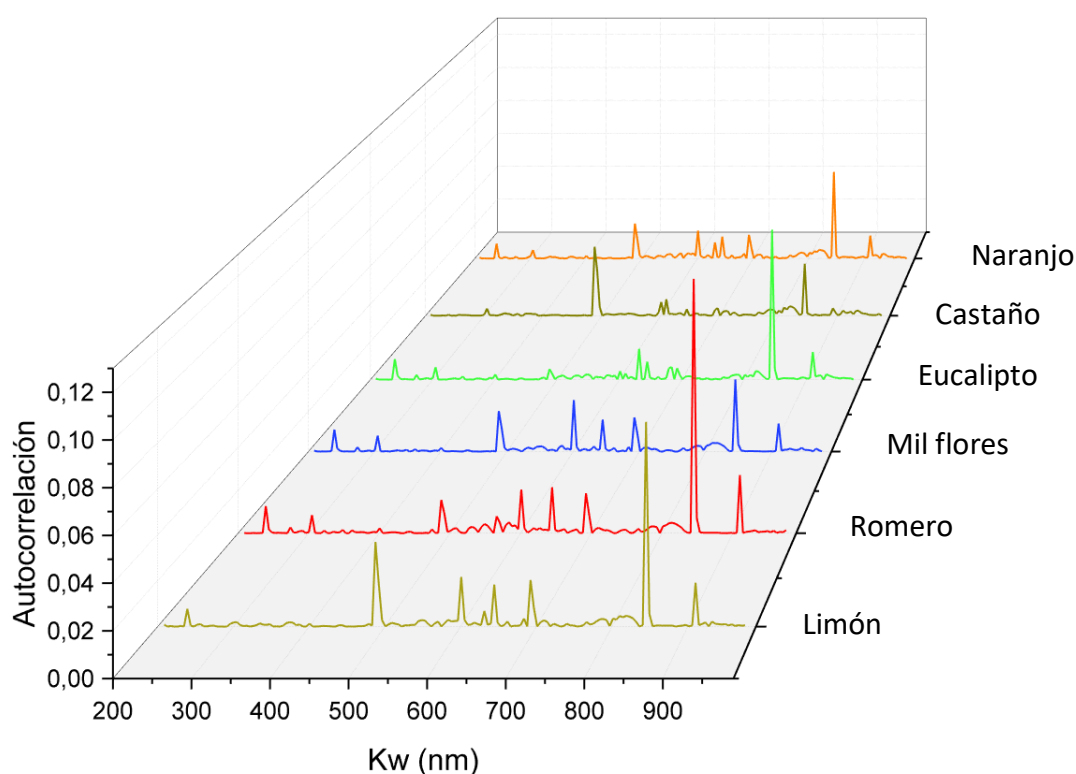
Para validar los algoritmos, se ha realizado el método de validación cruzada. La optimización de los parámetros de cada modelo se lleva a cabo utilizando la totalidad de las muestras excepto una y luego se evalúa el rendimiento utilizando el último punto. Este proceso de validación se repite hasta que cada punto de la muestra haya sido utilizado para la optimización del modelo y la validación de este.

### **Clasificación de muestras puras**

Para realizar la clasificación de las mieles puras, se utilizaron los 78 espectros de emisión LIBS generados a partir de las 6 muestras de miel y se determinaron las características más relevantes empleando un algoritmo selector de variables llamado Relief-F (RF) <sup>170</sup>, además del cálculo de los parámetros caóticos. Relief-F es un método de selección de características que actúa como un filtro, permitiendo distinguir entre instancias de diferentes clases. Calcula una puntuación característica de cada instancia pudiendo clasificar cada dato base de datos introducida. Con el uso del algoritmo RF, se redujeron los 3.814 puntos correspondientes a un espectro LIBS a 179 puntos, asimismo fue caracterizado por 179 parámetros de autocorrelación.

El algoritmo de RF seleccionó los pares de longitud de onda y emisión más importantes de entre los cuales, se encontraban los picos de emisión de los metales previamente mencionados. Más del 36 % de los valores seleccionados pertenecían al Ca (I), mientras que la mayoría de las variables independientes restantes, seleccionadas por RF, correspondían al K (I), Mg (II), Ca (II), y Na (I) (ver **Figura 38**).

Para describir los perfiles característicos de cada una de las mieles, se utilizaron los 179 puntos de autocorrelación (Kws) calculados. En la **figura 44**, se muestran los perfiles caóticos correspondientes a cada una de las seis muestras de miel pura analizadas.



**Figura 44.** Perfiles de los valores de autocorrelación calculados para cada una de las mieles.

En relación con la semejanza existente entre espectros LIBS, pertenecientes a mieles de origen botánico cítrico, en este caso, y atendiendo a los perfiles caóticos, se muestran completamente diferentes para Kw entre 200 y 980 nm. Los valores obtenidos para Kw = 850 nm son exclusivos para la mayoría de las mieles. En lo que respecta a las mieles de eucalipto y limón tienen valores similares para ese Kw, pero en contrapartida ofrecen señales diferentes para otros valores de Kw. Si nos fijamos en las mieles de mil flores y de castaño, tienen valores parecidos de Kw = 850 nm, pero con diferencias entre Kw = 525

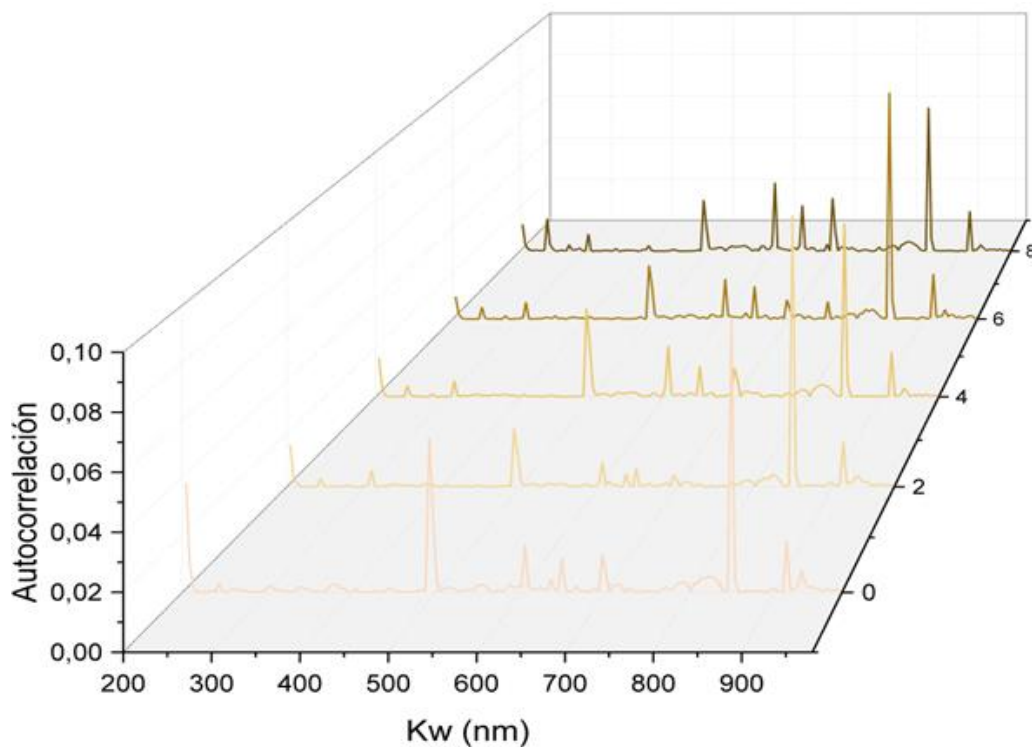
nm y  $K_w = 725$  nm. La miel de romero, por su parte, posee los picos más altos para los valores de  $K_w = 850$  nm y  $K_w = 910$  nm.

Dado que esta tendencia se repite en la mayoría de las muestras medidas, considerando estos parámetros como variables independientes, puede ser posible diseñar un modelo con un fuerte poder de clasificación. Para evaluar el potencial de estas variables independientes basadas en el caos, así como las localizadas por RF, se han utilizado modelos lineales simples para clasificar las muestras de miel en términos de origen botánico.

Los modelos probados fueron kNNs, donde las variables de entrada de estos modelos no supervisados son las características seleccionadas por RF o los parámetros caóticos calculados. Entre los principales parámetros de este modelo lineal, cabe destacar que la distancia aplicada es la euclídea, y el valor de  $k$  es 10 (cantidad de vecinos analizados). Con este sencillo modelo lineal, la precisión media de clasificación al utilizar los pares de longitud de onda de emisión LIBS más relevantes según RF fue del 91,3 %, mientras que cuando se emplearon los parámetros caóticos, la precisión mejoró al 95,8 %. La principal diferencia de estos enfoques es que el modelo caótico basado en parámetros tiene una visión general de todo el espectro LIBS, mientras que el modelo basado en RF sólo recibe información de picos específicos. Por otra parte, se observó que el mayor número de errores de clasificación se produjo en la miel multifloral, así como un número importante de clasificaciones erróneas entre mieles de limón y de naranja (cítricas).

### **Detección de mieles adulteradas**

Para la clasificación de las mieles puras con respecto a las muestras adulteradas con sirope de arroz en porcentajes variables del 2 al 8 % en peso, se utilizaron todos los espectros de emisión LIBS de las mieles adulteradas de limón, romero y multifloral, incluidas las mieles puras (195 espectros en total). Todos estos datos fueron usados para seleccionar las regiones más relevantes de los espectros y para poder calcular los parámetros caóticos, igual que en el caso anterior. En la **figura 45** se muestra un ejemplo de los perfiles caóticos de una miel adulterada, en este caso, la miel de limón.



**Figura 45.** Perfiles de los valores de autocorrelación calculados para la miel de limón adulterada con sirope de arroz (0 - 8 % en peso).

Como cabría esperar, las diferencias entre los espectros de emisión LIBS son menos apreciables que en el caso de la clasificación de las mieles puras. Las variables de entrada seleccionadas por RF no sólo están relacionadas con los metales antes mencionados (K (I), Mg (II), Ca (I), Ca (II) y Na (I)), sino que el 42 % de estas variables independientes están relacionadas con la presencia de  $N_2$  y  $O_2$  presentes en el aire ambiente. Esto dificulta el rendimiento del modelo kNN, lo que puede justificar los resultados con una tasa de error de clasificación superior al 30 %.

Si nos fijamos en los parámetros caóticos, las diferencias que se aprecian son menores que en el caso de la clasificación de las mieles puras. Esto se debe a la semejanza entre muestras adulteradas, referido en términos de composición de estas. Hay que destacar que las muestras binarias que se intentan clasificar tienen una concentración de adulterante baja, por debajo del 8 %, lo cual refuerza los resultados obtenidos.

Se realizaron tres modelos matemáticos diferentes basados en los parámetros caóticos calculados para las muestras de miel adulteradas, cuya diferencia residía en el umbral establecido respecto a la proporción de sirope de arroz contenido en la muestra: 2 %, 4 %

y 6 % en peso. Los modelos empleados para llevar a cabo estas clasificaciones fueron modelos no supervisados basados en kNN, donde las variables de entrada eran los parámetros caóticos. La distancia aplicada para la clasificación era la correspondiente a la distancia euclídea y un valor de  $k = 10$  (número de vecinos verificados). Los principales resultados obtenidos de los tres modelos quedan reflejados en la **tabla 9**.

**Tabla 9.** Resumen de los resultados obtenidos por los kNNs según el umbral de la concentración de sirope de arroz en la clasificación de muestras adulteradas.

Umbral (% en peso)	Precisión de clasificación durante la validación cruzada (%)
2	87.2
4	90.1
6	91.2

Viendo los resultados obtenidos, se puede apreciar un aumento en la precisión de la clasificación según va incrementando el umbral del porcentaje de adulterante, hasta alcanzar un 91 % cuando solamente muestras conteniendo de 6 a 8 % de sirope de arroz se clasifican frente a las puras. Estos datos tienen sentido ya que los parámetros caóticos de las muestras de miel con mayor porcentaje de sirope de arroz deben diferir en mayor proporción en los cálculos con respecto a las muestras de miel pura (**figura 45**). Hay que señalar que los porcentajes reales de adulterantes presentes en mieles suelen estar muy por encima de las concentraciones utilizadas, lo que da mayor peso a los resultados obtenidos en los modelos caóticos. Además, tres tipos diferentes de miel se englobaron en los modelos, proporcionando una gran versatilidad, ya que el modelo opera de forma precisa independientemente del origen botánico y geográfico de las mieles.

El modelo basado en RF ofrece unos resultados mucho peores que el modelo caótico de kNN, pudiéndose deber a que el modelo basado en caos tiene en cuenta todo el espectro LIBS mientras que las variables de RF sólo reciben información de los picos seleccionados. Otro aspecto a considerar son los errores en las clasificaciones, que pueden tener su origen en la procedencia de las muestras (origen botánico) usadas conjuntamente para diseñar los modelos de kNN. Para evaluar este hecho, se diseñaron tres modelos

diferentes de kNN para cada miel adulterada, usando los parámetros caóticos como variables independientes (los resultados se muestran en la **tabla 10**).

**Tabla 10.** Resultados obtenidos en la clasificación de las muestras según la concentración de sirope de arroz, para cada variedad de miel examinada.

Umbral (% en peso)	Precisión de clasificación durante la validación cruzada (%)		
	Limón	Romero	Multifloral
2	92.4	93.0	90.3
4	95.0	94.6	92.2
6	95.8	95.1	93.0

Al comparar los resultados expuestos en las **tablas 9 y 10**, la precisión de la clasificación ha mejorado entre un 2 y un 6 %, lo que denota una mejora considerable (son resultados lógicos ya que estas bases de datos son más homogéneas que la global (**tabla 9**) que contiene espectros de los tres tipos de miel). La miel multifloral arroja los peores valores de precisión en la clasificación posiblemente debido a su heterogeneidad.

Como se ha podido demostrar, la espectroscopia de descomposición inducida por láser (LIBS) unida a algoritmos basados en parámetros caóticos, han sido capaces de caracterizar mieles puras independientemente del origen botánico, además de las posibles adulteraciones. Todo ello se consiguió mediante la información extraída de los espectros LIBS de emisión y con un simple clasificador lineal no supervisado. Los resultados obtenidos han mostrado errores de clasificación menores del 5 % si hablamos de mieles puras y menores del 10 % en muestras adulteradas con concentraciones menores del 6 % en peso. Por esta razón, la integración de LIBS y parámetros caóticos ofrecen una potencialidad para la detección de actividades fraudulentas en el sector de la miel, así como el control de calidad en otros sectores alimentarios o industriales.

Estos resultados demuestran la capacidad que presenta esta técnica para ser la base del control de calidad en el sector apícola. Esto unido a las pruebas mostradas anteriormente, abre una gran puerta dentro del sector alimentario. Dada la situación económica del sector alimentario y con el objetivo de abaratar las técnicas analíticas empleadas para el control de calidad en determinadas áreas del sector alimentario, se testará en adelante el uso de fuentes notablemente más económicas como es el caso del láser continuo.

## 3.2 Láser Continuo

En los tres bloques de experimentos que se presentan a continuación, se utilizará un diodo láser como fuente de luz continua y se tratará, no solo la miel, sino también muestras de aceite de oliva virgen extra (AOVE) y vinagre para el análisis de la calidad y potencial clasificatorio del prototipo diseñado a este efecto.

Antes de la concepción del equipo portable descrito con anterioridad, se hizo un testeo del método utilizando un cubo metálico donde realizar medidas con diodo led y miel<sup>27</sup>. Viendo que el método era efectivo, se fue un paso más allá, construyendo un cubo en 3D (lo que abarata los costes) y probando su valía<sup>78</sup>. Fruto de los buenos resultados se optó por crear un equipo que diese cabida a poder medir *in situ*, por ejemplo, como equipo de control de calidad del aceite de oliva virgen extra en una almazara. Se crea un dispositivo capaz de medir mediante emisión de fluorescencia por medio de diodo láser. Esto no solo reduciría notablemente el coste, sino que además presenta unas características muy importantes de facilidad de manejo y portabilidad.

Se pretende diseñar y validar un prototipo para la clasificación de alimentos y para la detección de adulteraciones. Los alimentos con los que se validará el equipo serán incluidos en tres bloques de experimentos, el primero referido al AOVE, el segundo enfocado a la miel y el tercero correspondiente al vinagre.

### 3.2.1 Caracterización de las mieles de origen español

En este grupo de experimentos, se ha llevado a cabo la validación de la fluorescencia como una opción adecuada para la caracterización y la autenticación de la miel. Los dos factores fundamentales que determinan la autenticidad de la miel son su origen (geográfico y botánico) y su producción (recolección y elaboración)<sup>171</sup>. Se ha incluido un enfoque matemático que se ha desarrollado para realizar la caracterización de las muestras de miel. Las marcas, los tipos y los orígenes geográficos de las muestras de miel, así como el sirope de arroz empleado durante esta investigación, se muestran en la **tabla 11**. Las mieles que se han adquirido son de marcas prestigiosas en el sector, y certifican en su etiqueta que el origen botánico es auténtico.

**Tabla 11.** Tipos y marcas de miel (y sirope de arroz) usadas en la experimentación.

Muestra	Origen geográfico	Marca
Miel de Acacia	España	Luna de miel
Miel de Limón Ecológica	España	Bona Mel
Miel de Romero	España	La Obrera
Miel de Mil Flores	España	Granja San Francisco
Miel de Castaño Ecológica	España	Hijas del Sol
Sirope de Arroz	Francia	Danival

Se prepararon un total de 85 muestras correspondientes a 5 diferentes tipos de miel, **figura 46**, adulterados con porcentajes crecientes de sirope de arroz (del 1 al 8 % en peso). Se utilizó el sirope de arroz por ser uno de los adulterantes usados en la adulteración de la miel y que suele ser difícilmente identificable<sup>171</sup>. Se realizaron dos series por cada tipo de miel, originando 16 muestras de cada miel, además de las respectivas muestras puras. En este bloque de experimentos, se determinará si este enfoque analítico es adecuado para la caracterización de mieles de orígenes botánicos variados y de la detección de posibles adulteraciones.

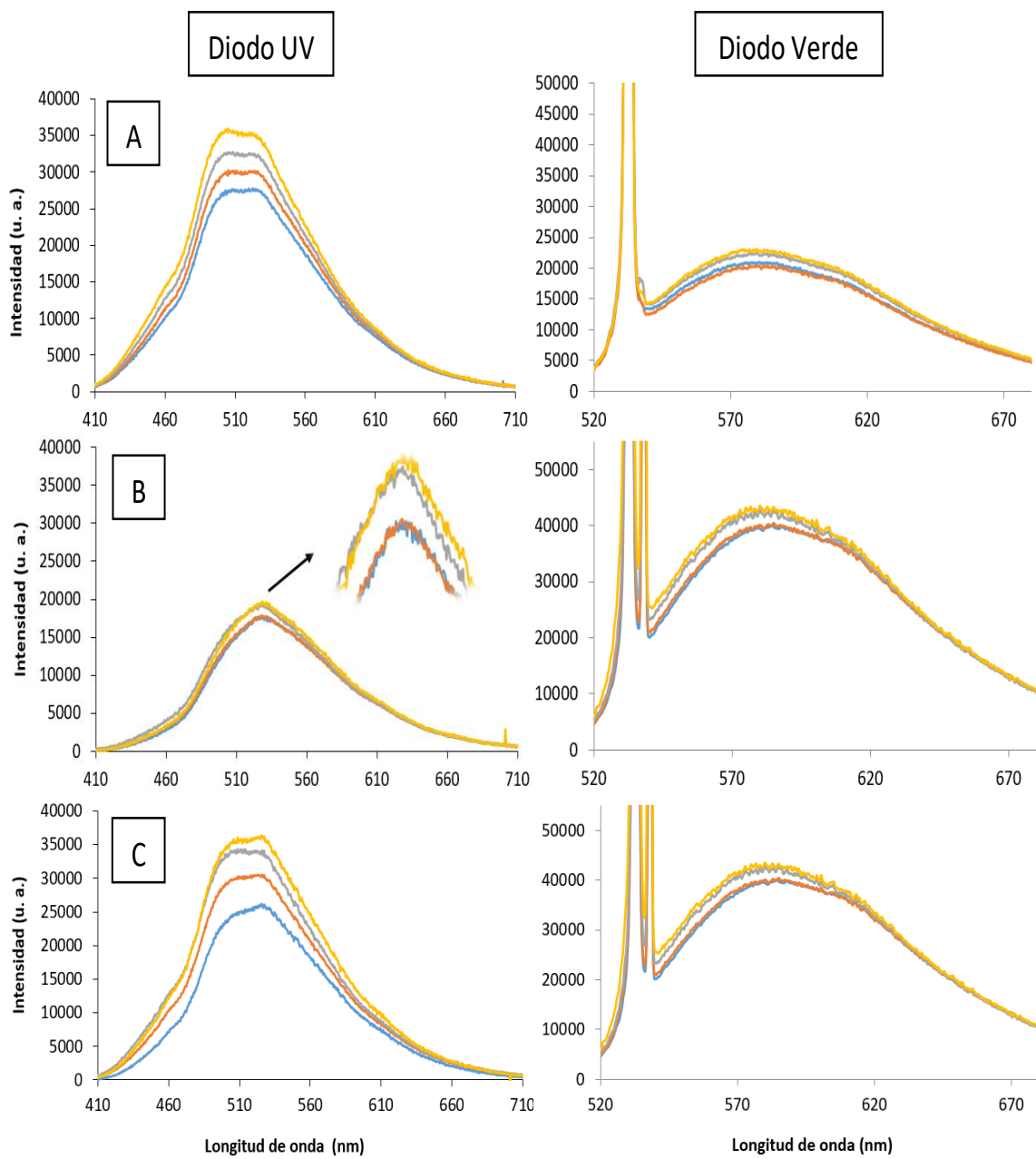


**Figura 46.** De izquierda a derecha: sirope de arroz, miel de romero, miel de acacia, miel de limón, miel de mil flores y miel de castaño.

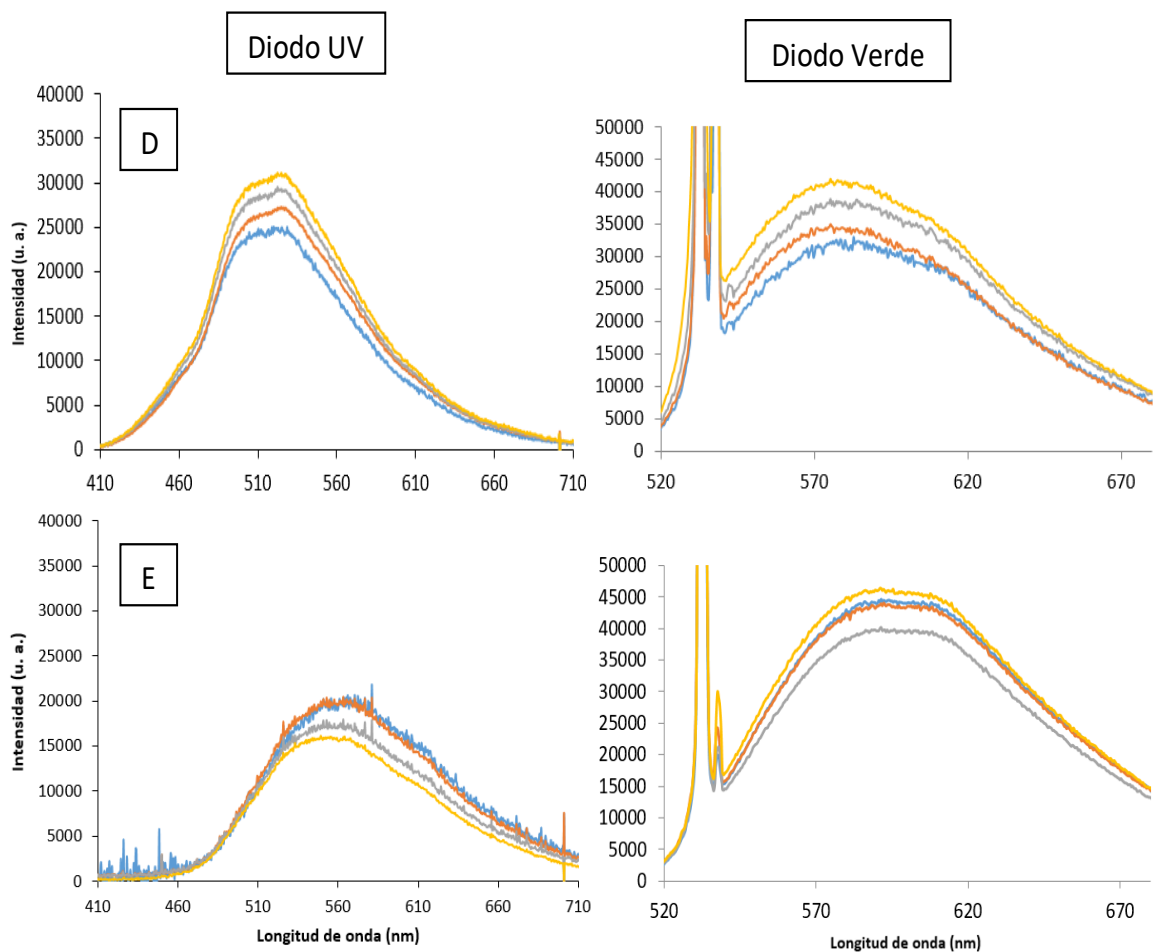
Todas las medidas de cada muestra se realizaron en las mismas condiciones experimentales. El procedimiento experimental consistió en varios pasos: (i) se prepararon viales de 10 g de peso (balanza analítica A&D, modelo HR-150a) y se mantuvieron durante 24 horas en un baño a una temperatura de 52 grados (baño termostático Raypa, modelo BAD-4) para facilitar la homogeneización de las mieles; (ii) se dejaron enfriar las muestras hasta temperatura ambiente antes de su medición; (iii) los espectros de fluorescencia obtenidos finales para cada muestra se obtuvieron a partir de un promedio de tres mediciones.

Como se puede observar en investigaciones recientes<sup>27, 172,173</sup>, las técnicas fluorescentes sirven como herramienta analítica para obtener una información referente a la caracterización de la miel. En este caso, se va un paso más allá, no sólo caracterizando las muestras, sino detectando y cuantificando posibles adulteraciones en la miel.

Las mediciones se llevaron a cabo en el equipo de fluorescencia portátil descrito anteriormente, compuesto por dos fuentes de emisión: diodo UV de longitud de onda y potencia de 405 nm y 500 mW, respectivamente; y diodo verde de longitud de onda y potencia de 532 nm y 100 mW, respectivamente. En el caso del diodo UV, las mieles se midieron con un tiempo de integración de 0,5 s, a excepción de la miel de castaño que necesitó 5 segundos (esta miel, de tonalidad oscura, absorbe a esta longitud de onda mayor cantidad de radiación lo que repercute en la emisión fluorescente). En lo referido al diodo verde, todas las muestras pudieron ser medidas con el mismo tiempo, 0,8 s. Los espectros de emisión finales se han representado, separados en función del tipo de miel y diodo empleados (**figura 47 y 48**). Las líneas de los espectros representados corresponden a las muestras puras (azul), adulteradas en un 1% (naranja), 3% (gris) y 5% (amarillo).



**Figura 47.** Espectros de las mieles de Acacia (A), Mil Flores (B) y Romero (C).



**Figura 48.** Espectros de las mieles de Limón (D) y Castaño (E).

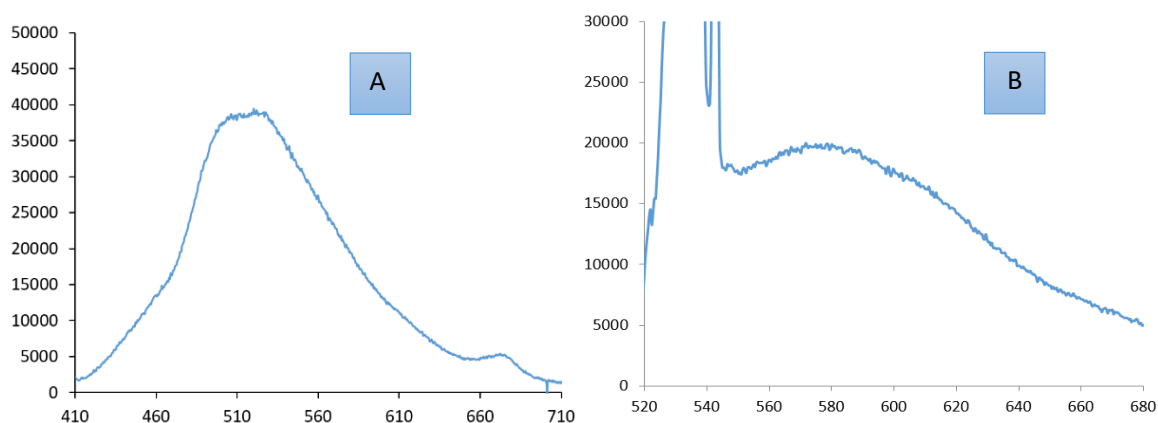
Los perfiles de fluorescencia de las mieles están determinados por varios componentes<sup>174</sup>. Esta fluorescencia se atribuye a: **compuestos fenólicos y polifenólicos** presentes en la miel<sup>175,176</sup>, **aminoácidos aromáticos** (triptófano)<sup>177,178</sup>, **riboflavina** (vitamina B2)<sup>179</sup> y **productos de la reacción de Maillard**<sup>180</sup>, como puede ser el HMF, **figura 25**. Los compuestos fenólicos y polifenólicos son buenos indicadores del origen botánico y geográfico de la miel<sup>181</sup>. En la **tabla 12** se muestran las longitudes de excitación/emisión que presentan los compuestos fluorescentes.

**Tabla 12.** Rango de longitudes de excitación/emisión compuestos fluorescentes presentes en la miel<sup>182</sup>.

Fluoróforo	Longitud de onda excitación/emisión (nm)
Fenoles y polifenoles	320 nm / 410 nm
Aminoácidos aromáticos	275 nm / 343 nm
Riboflavina	450 nm / 525 nm
Productos de la reacción de Maillard	350 nm / 440 nm

Atendiendo a los perfiles que presentan las distintas mieles (**figuras 47 a 56**), se pueden observar dos intervalos de longitudes de onda de emisión según la fuente con la que fueron irradiadas. En el caso del diodo UV (405 nm) la banda de longitudes de onda de emisión está en torno a 515 – 560 nm en función del tipo de miel. Para el diodo verde (532 nm) la banda de longitudes de onda de emisión se sitúa entre 580 y 600 nm. Sabiendo las longitudes de onda de emisión que presentan los diferentes fluoróforos presentes en la miel, es difícil asignar con certeza las moléculas exactas responsables de las emisiones descritas<sup>27</sup>; resultado de un solapamiento de las bandas de emisión, haciendo difícil la asignación de moléculas. Los espectros de emisión pertenecientes a las diferentes mieles excitadas con el diodo verde muestran un pico de emisión en torno a 532 nm, el cual corresponde a la emisión del propio diodo.

Antes de analizar más en detalle, cabe representar los espectros correspondientes al sirope de arroz puro, (**figura 49**).



**Figura 49.** Espectros de emisión correspondientes al sirope de arroz puro medido con diodo UV (A) y verde (B).

Se observan dos hechos fundamentales, el primero de ellos es que las mieles monoflorales a diferencia de la miel de mil flores, tienen una mayor separación entre bandas cuando la concentración de adulterante (sirope de arroz) aumenta. El segundo hecho hace referencia a la longitud de onda de emisión, donde la mayoría de las mieles coinciden a excepción de la miel de castaño, de tonalidad más oscura. A diferencia de otro tipo de mieles presenta cantidades relativamente más altas de hidroxicinamatos (como son los ácidos p-cumárico, cafeico y ferúlico) y de fenilalanina<sup>172</sup>, lo que puede explicar la diferencia en los espectros. Se puede decir que según va en aumento la concentración de sirope de arroz, la emisión fluorescente crece, a excepción de la miel de castaño, que disminuye en intensidad y su máximo de emisión se desplaza hacia el máximo del sirope que está a longitudes de onda menores (515 nm). En lo que respecta a los datos de los espectros obtenidos con el láser verde, debería haber una disminución a priori de la intensidad al aumentar la concentración de adulterante al tener éste un máximo de emisión por debajo de todas las mieles. Si es cierto, que el aumento en intensidad en este caso no es tan acusado como pasaba con el láser UV.

Con estos datos es difícil sacar conclusiones determinantes de si es posible detectar con exactitud la cantidad de adulterante en mezclas con mieles debido a la dificultad de los datos obtenidos ya que aunque se intentaron aplicar algoritmos matemáticos no se obtuvieron buenos resultados, lo que se plantea la posibilidad de medir en condiciones muy específicas donde se controle la temperatura de mezcla para no dañar las muestras y la forma de medirlas para que sean lo más reproducibles posibles.

### **3.2.2 Influencia del almacenamiento en la calidad de los AOVE**

En este bloque de experimentos, se combina la espectroscopia de fluorescencia con herramientas quimiométricas basadas en algoritmos matemáticos inteligentes. Para ello se realizó el estudio del efecto de las diferentes condiciones de almacenamiento de tres AOVE monovarietales (Arbequina, Cornicabra y Picual). También se realizó un seguimiento de los AOVE adulterados con AOVE fuera de fecha, siguiendo el mismo método. Las condiciones llevadas a cabo fueron en presencia/ausencia de luz y contenidos en recipientes de materiales distintos (**figura 50**).



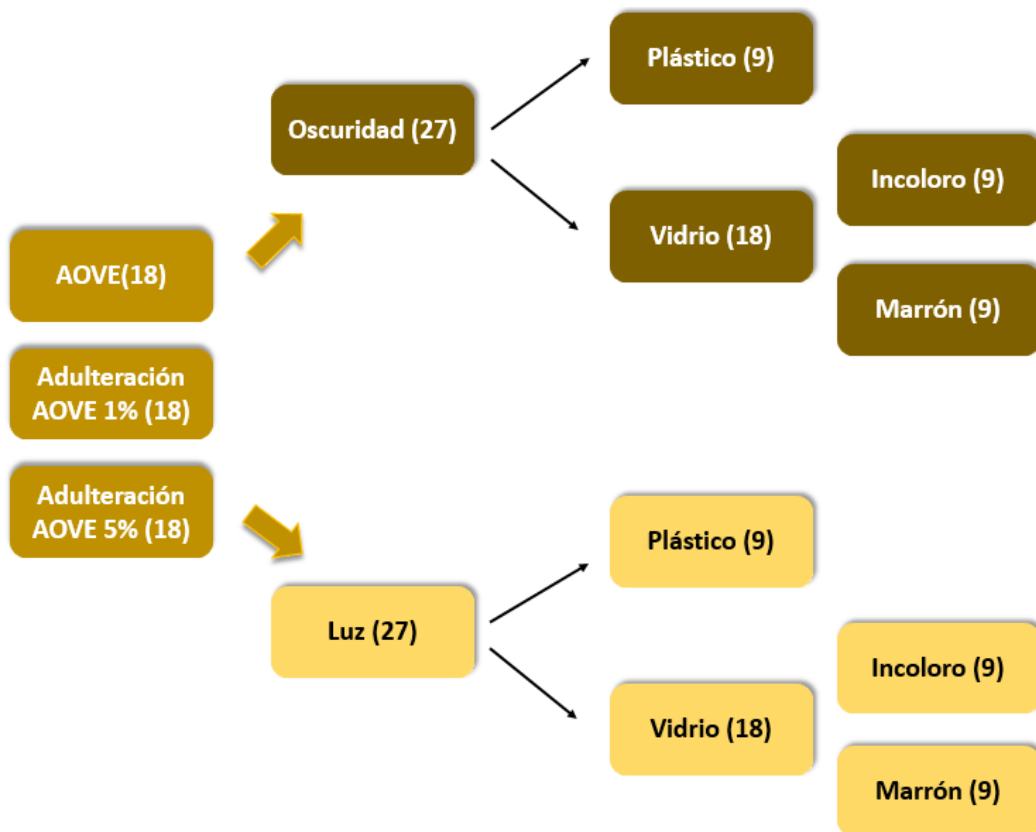
**Figura 50.** Recipientes utilizados durante el ensayo

Se prepararon un total de 54 muestras. 18 de ellas pertenecían a cada AOVE fresco (**tabla 13**). De esas 18 muestras, 6 eran de AOVE puro y las otras 12 estaban mezcladas con AOVE fuera de fecha al 1 % (6 muestras) y al 5 % (6 muestras) en peso.

**Tabla 13.** Aceites de oliva virgen extra usados en la experimentación.

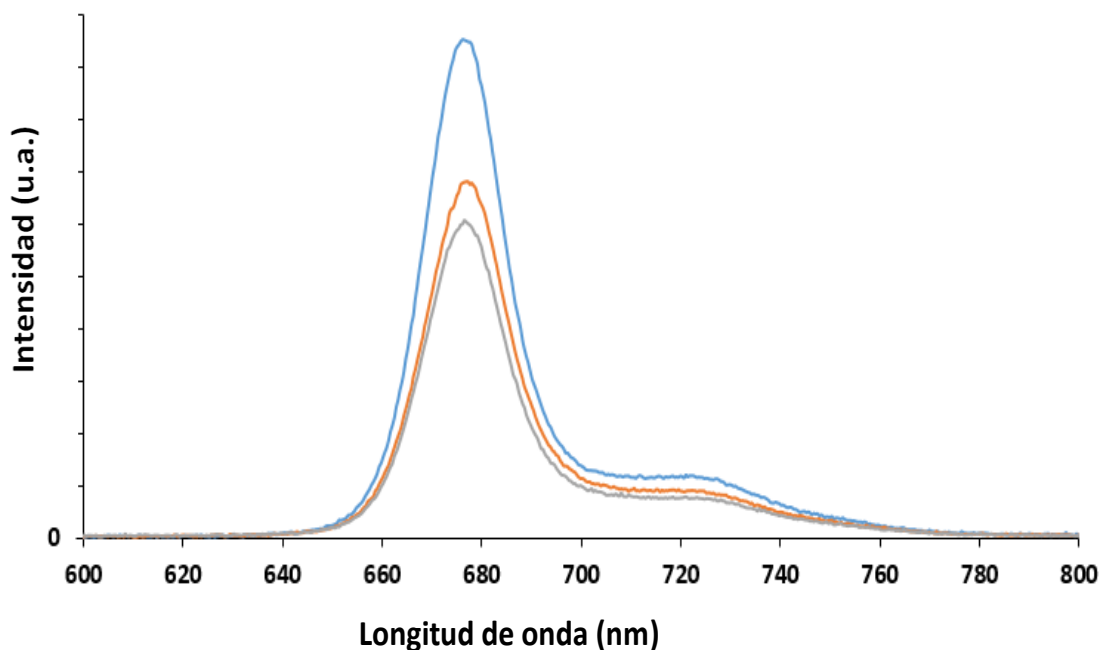
Marca de AOVE	Variedad
Marques de Griñón	Arbequina
Enclaves D. Oro	Cornicabra
Castillo de Tabernas	Picual
AOVE fuera de fecha	Mezcla

Todas las muestras fueron almacenadas bajo condiciones específicas durante un periodo de 58 días. Por cada AOVE monovarietal, la mitad de las muestras (9) fueron expuestas a la luz del sol, mientras que las restantes se almacenaron en total oscuridad. Un tercio de las 9 muestras se almacenaron en plástico incoloro (politereftalato de etileno; PET), otro tercio en vidrio incoloro y el último en vidrio marrón (**figura 51**). Para cada posible adulteración y/o condición de almacenamiento, se prepararon tres muestras diferentes (una por cada variedad de AOVE).



**Figura 51.** Esquema del almacenamiento de las muestras analizadas.

Cada una de las muestras fue medida mediante fluorescencia, utilizando como fuente de excitación un láser continuo UV con un máximo de emisión a 405 nm y una cubeta de cuarzo para poder medirla. El sensor utilizado para la experimentación fue el propuesto en el bloque de experimentos anterior (cubo producido por impresora 3D), un espectrómetro CCD para la recogida de la señal (25 ms de excitación) y un ordenador para visualizar el espectro generado. Cada una de las 54 muestras de AOVE se midieron 10 veces durante los 58 días que duró la experimentación. Todas las medidas se hicieron por triplicado y el promedio de los tres espectros se utilizó para poder cimentar las bases de datos para el diseño y entrenamiento de los modelos inteligentes. En la **figura 52** se muestra un espectro obtenido de una muestra de la variedad Cornicabra pura, comparada con otras dos, una expuesta a la luz y otra en total oscuridad, ambas después de 58 días.

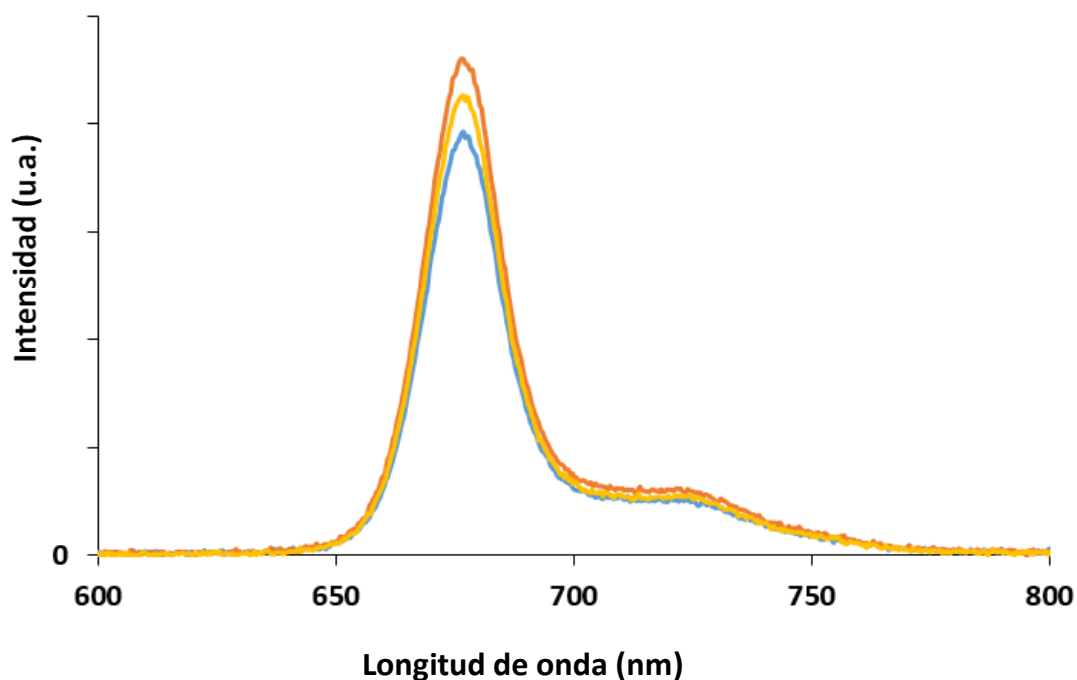


**Figura 52.** Espectros comparativos de Cornicabra pura (azul) y día 58 con luz (gris) y sin luz (naranja).

Como se muestra en la **figura 52**, aparece una banda fluorescente principal de 650 a 750 nm, (la principal banda de emisión se encuentra a 670 nm y el hombro a 735 nm). Esto significa que los mismos tipos de moléculas (clorofilas y feofitinas) absorben la luz y conducen a la misma banda de emisión<sup>183</sup>.

Al analizar los datos de fluorescencia obtenidos de las muestras, se observa que la incidencia de la luz solar influye en el desarrollo de las emisiones de AOVE, ya que existe una clara diferencia entre los espectros de la muestra mantenida en la oscuridad y la expuesta a la luz, **figura 52**. En particular, la intensidad de emisión de la banda principal de emisión que cubre de 650 a 750 nm de muestras de AOVE almacenadas bajo iluminación es significativamente inferior a la de las muestras mantenidas en la oscuridad. Este efecto está presente en muestras de AOVE puro y adulterado y puede estar relacionado con las cantidades de pigmentos que absorben la luz azul centrada a 461 nm<sup>184,185</sup>.

Por otro lado, la degradación del AOVE depende principalmente de la cantidad de energía o fotones que permite atravesar el envase, ya que el material oscuro protege la calidad del producto mejor que los recipientes transparentes<sup>186</sup>, **figura 53**.



**Figura 53.** Espectro de emisión correspondiente al AOVE variedad Picual, adulterado en un 1 %, mantenido bajo luz (día 44) y almacenado en bote de cristal oscuro (naranja), plástico transparente (amarillo) y cristal transparente (azul).

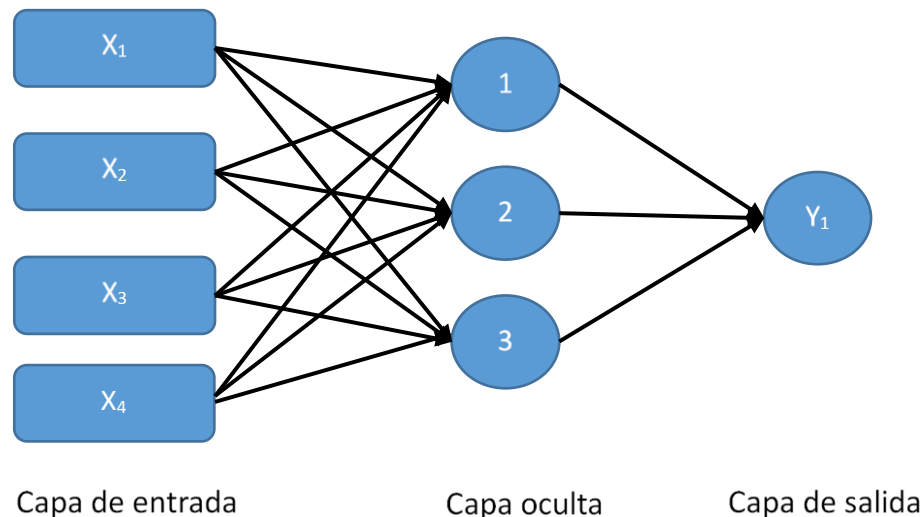
Como se aprecia en la gráfica la emisión del aceite almacenado en bote oscuro presenta mayor emisión que los botes transparentes y si comparamos el bote de cristal y el de plástico, ofrece mayor “protección” el bote transparente al dejar pasar menos fotones a través suyo.

### Tratamiento matemático

Todas las mediciones de fluorescencia se agruparon en cuatro categorías para construir cuatro modelos matemáticos inteligentes. Estos grupos corresponden a las condiciones estudiadas: (1) adulteración (presencia o ausencia), (2) ambiente de almacenamiento (luz u oscuridad), (3) material del envase (plástico o vidrio), y (4) color del vidrio (incoloro o marrón). Para cada categoría se definió una variable dicotómica dependiente "sí" (1) o "no" (0).

Para estimar las condiciones de almacenamiento (*vide supra*), se han analizado los espectros de fluorescencia de las muestras de AOVE con modelos matemáticos inteligentes basados en redes neuronales artificiales (RNA) y, en particular, el perceptrón multicapa supervisado (MLPs; del inglés “*MultiLayer Perceptron*”)<sup>187</sup>. Los MLPs han sido

diseñados para actuar como clasificadores binarios para distinguir las condiciones de almacenamiento en las que se guardan las muestras de AOVE, (la **figura 54** muestra la arquitectura de capas de estos algoritmos, así como las unidades que los forman).



**Figura 54.** Esquema de un perceptrón binario multicapa clasificador (topología: 4, 3, 1) que contiene cuatro variables independientes (entradas), tres neuronas ocultas y una variable dependiente categórica (salida u objetivo).

Para alcanzar modelos precisos, fiables y útiles, un conjunto de parámetros ponderados (pesos), deben ser optimizados durante la fase de entrenamiento de tal manera que se evite la creación de algoritmos sobreajustados<sup>188</sup>. Esto se lleva a cabo con una segmentación adecuada de la base de datos en diferentes conjuntos de datos (aprendizaje, verificación y validación). Además, varias funciones y parámetros deben ser seleccionados y/o optimizados adecuadamente. Estos incluyen las funciones de entrenamiento y transferencia, el número de neuronas ocultas (HNN), y un conjunto de coeficientes de aprendizaje (Lc, Lc-decremento (Lcd) y Lc-incremento (Lci))<sup>187</sup>.

Una vez optimizado cada modelo MLP, es necesario validar su capacidad de generalización y aplicabilidad con otros casos interpolados, no implicados en el proceso de modificación de pesos. A este respecto, se ha aplicado una validación cruzada y una validación interna. La prueba de validación cruzada ( $k = 6$  en este caso), utilizada como verificación en sucesivas fases de entrenamiento. Para la validación interna, la base de datos se divide en tres conjuntos de datos diferentes: entrenamiento, verificación y validación (o prueba), cada uno con el 70 %, 20 % y 10 % de la base de datos original, respectivamente. Los datos

de validación se dejan de lado durante los procesos de aprendizaje y optimización del modelo, por lo que esta validación nos permitirá saber si el MLP es capaz de interpolar con precisión con datos que nunca han sido presentados a la RNA. Cada modelo de MLP fue validado diez veces usando diferentes pesos aleatorios iniciales para encontrar la mejor matriz de pesos finales. Estos parámetros fueron optimizados para las cuatro clasificaciones realizadas de acuerdo con el mejor desempeño de cada modelo.

En el proceso de optimización, existen otros parámetros intrínsecos del modelo basado en MLP que necesitan consideración adicional antes de que el modelo esté completamente optimizado y listo para ser utilizado. Estos parámetros son la función de entrenamiento, la función de transferencia, el número de neuronas ocultas (HNN) y los coeficientes de aprendizaje (Lc, Lc-decremento (Lcd) y Lc-incremento (Lci))<sup>187</sup>. La elección de una función de entrenamiento adecuada es significativa ya que controla los algoritmos en el proceso de aprendizaje del modelo<sup>189</sup>. El algoritmo Levenberg-Marquardt (función de entrenamiento) se utilizó aquí porque proporciona resultados rápidos y satisfactorios con modelos similares a los utilizados para llevar a cabo esta investigación<sup>189</sup>. Por otro lado, la función sigmoide fue elegida como función de transferencia, lo que restringe el rango de las respuestas emitidas de cualquier neurona entre 0 y 1<sup>187</sup>.

El HNN debe ser ajustado hasta que el modelo alcance su mejor rendimiento, y para lograrlo, se siguió una estrategia heurística, considerando que el número de pesos a optimizar nunca debe ser mayor a la mitad de la suma de los datos de entrada para escapar de los efectos de sobreajuste. Finalmente, para determinar los valores adecuados de Lc, Lcd y Lci, se probaron diferentes valores y combinaciones de cada uno. Los valores posibles de Lc y Lcd oscilaron entre 0,001 y 1, mientras que los de Lci oscilaron entre 2 y 100<sup>187</sup>. El requisito definido en el diseño experimental era obtener el menor número de errores de clasificación. Todos los procesos de cálculo, diseño y optimización de los modelos matemáticos se han realizado con MATLAB 2018a, y los parámetros óptimos para cada modelo MLP se muestran en las **tabla 14**.

**Tabla 14.** HNN optimizado y coeficientes de aprendizaje (Lc, Lcd, Lci) de cada modelo MLP diseñado.

Grupo de HNN	AOVE	HNN	Lc	Lcd	Lci
Contenido de adulterante	Arbequina	3	1	0,17	51
	Cornicabra	3	0,84	0,84	84
	Picual	3	0,25	1	51
Luz solar	Arbequina	3	0,67	0,42	43
	Cornicabra	3	0,84	0,59	43
	Picual	4	0,34	0,84	84
Continente	Arbequina	3	0,17	0,25	26,5
	Cornicabra	4	0,59	0,84	18
	Picual	3	1	0,42	35
Tipo de vidrio	Arbequina	3	0,67	0,09	100
	Cornicabra	3	1	0,67	18
	Picual	3	0,34	0,001	51

Una vez que los modelos están optimizados y preparados para llevar a cabo sus clasificaciones, sería el momento de validarlos para demostrar que los MLPs finales son capaces de estimar con precisión las condiciones de almacenamiento de las muestras de EVOO.

### Principales resultados de validación

En este apartado se muestran los principales resultados de cada una de las partes analizadas en este grupo de experimentos, considerando las muestras adulteradas y puras sometidas a distintas condiciones de almacenamiento. En la **tabla 15** se muestran los resultados del MLP entrenada para detectar muestras de AOVE adulteradas.

**Tabla 15.** Rendimientos estadísticos de cada MLP desarrollado para clasificar muestras adulteradas mediante validación interna (VI) y validación cruzada k-fold (k=6).

AOVE	Tipo	K-fold (%)	VI (%)
Arbequina	Puro	50,0	87,5
	Adulterado	92,9	85,7
Cornicabra	Puro	77,8	88,9
	Adulterado	88,9	100,0
Picual	Puro	85,7	92,8
	Adulterado	73,7	89,5

Los resultados estadísticos de estos modelos durante las validaciones internas abarcaron una precisión de entre el 86 y el 100 %. A la vista de los resultados mostrados en la **tabla 15**, la validación interna muestra mejores resultados que el K-fold (validación cruzada). En el primer caso, el mejor porcentaje correspondería al AOVE Cornicabra y en el segundo obtendríamos el mejor resultado en el AOVE Arbequina. Pero viendo los buenos resultados se podría saber con bastante certeza si el AOVE se encuentra adulterado. Por otro lado, los resultados estadísticos de las MLPs obtenidos después de clasificar las muestras según su estado de iluminación se muestran en la **tabla 16**.

**Tabla 16.** Rendimientos estadísticos de cada MLP desarrollado para determinar si el AOVE se almacenó en la oscuridad o bajo la luz del sol mediante validación interna (VI) y validación cruzada k-fold (k=6).

AOVE	Tipo	K-fold (%)	VI (%)
Arbequina	Luz	76,5	94,1
	Oscuridad	73,7	78,9
Cornicabra	Luz	94,4	100,0
	Oscuridad	94,4	100,0
Picual	Luz	78,9	84,2
	Oscuridad	85,7	100,0

Los resultados estadísticos de estos modelos durante las validaciones internas abarcaron una precisión de entre el 79 y el 100 %. De acuerdo con estos resultados, se verifica que

una forma adecuada de determinar si una muestra de AOVE se ha mantenido expuesta a la luz solar o almacenada en la oscuridad es utilizar la información de los espectros de fluorescencia recogidos. Esta herramienta puede ser útil para tratar de evaluar como se ha tratado a un producto durante cadena de distribución o en las tiendas. En este caso, los mejores resultados a la hora de poder determinar si el AOVE fue guardado en la oscuridad son para el AOVE Cornicabra.

En la **tabla 17** se muestra el rendimiento de los modelos MLP para determinar el material de envasado del AOVE (las muestras en vidrio marrón no se incluyeron en esta clasificación).

**Tabla 17.** Rendimientos estadísticos de cada MLP desarrollado para identificar el envase (vidrio incoloro o PET) en el que se almacenó el AOVE mediante validación interna (VI) y validación cruzada k-fold (k=6).

AOVE	Tipo	K-fold (%)	VI (%)
Arbequina	Plástico	78,3	91,3
	Vidrio	76,9	84,6
Cornicabra	Plástico	96,0	76,9
	Vidrio	54,5	90,9
Picual	Plástico	78,3	91,3
	Vidrio	90,0	100,0

Los resultados estadísticos de estos modelos durante las validaciones internas abarcaron una precisión de entre el 77 y el 100 %. Según los datos expuestos en la **tabla 17**, se puede determinar con mayor precisión que el AOVE Picual ha estado almacenado en vidrio (con un 100 % de acierto en validación interna). El AOVE Cornicabra tiene el mayor porcentaje de acierto (96 % de acierto en validación cruzada) a la hora de poder identificarlo si ha estado almacenado en plástico. Todos estos datos tienen una gran valía al poder determinar la calidad de un aceite en función del tipo de envase ya que no todos los envases afectan de la misma manera a las propiedades organolépticas del AOVE.

Y finalmente, los modelos basados en MLP para la determinación del color del envase de vidrio (sin color o marrón) también fueron estimados y se muestran en la **tabla 18** (las muestras en plástico fueron dejadas fuera de esta clasificación).

**Tabla 18.** Rendimientos estadísticos de cada MLP desarrollado para identificar el color del envase de vidrio (incoloro o marrón) en el que se almacenó el AOVE mediante validación interna (VI) y validación cruzada k-fold (k=6).

AOVE	Tipo	K-fold (%)	VI (%)
Arbequina	Marrón	95,2	90,5
	Incoloro	73,3	93,3
Cornicabra	Marrón	80,9	85,7
	Incoloro	66,7	93,3
Picual	Marrón	91,7	100,0
	Incoloro	88,9	88,9

Los resultados estadísticos de estos modelos durante las validaciones internas abarcaron una precisión de entre el 86 y el 100 %. Comparando los datos de la **tabla 18**, se aprecian los mejores valores de acierto en el caso del AOVE Picual con un 100 % (k-fold) y del 95,2 % en la validación interna en el AOVE Arbequina.

Una vez vistos los resultados y el rendimiento estadístico de los modelos MLP en cada uno de los casos, se puede decir que el enfoque basado en la combinación de datos de fluorescencia y modelos no lineales inteligentes son adecuado para determinar las condiciones de almacenamiento (exposición a la luz y tipo de contenedor) en las que se ha mantenido el AOVE, así como para localizar posibles muestras adulteradas fraudulentamente. Este enfoque quimiométrico puede ser muy útil para llegar a herramientas que permitan controlar las condiciones de la cadena de distribución, facilitando así la preservación de la calidad del AOVE desde su salida de la almazara hasta el consumidor final. En esta línea se ha desarrollado otro grupo de experimentos donde se abordara la determinación y cuantificación de las adulteraciones del AOVE de denominación de origen.

### **3.2.3 Adulteración del AOVE con denominación de origen protegida**

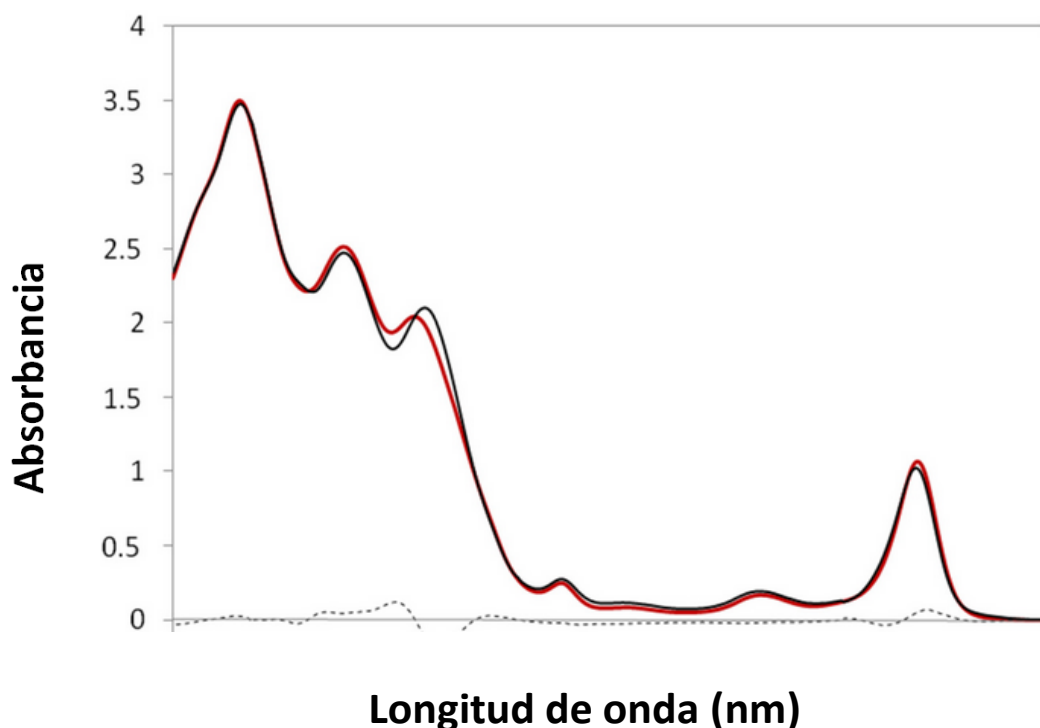
En este bloque de experimentos se tratará la problemática que existe con los AOVES con denominación de origen protegido (DOP)<sup>77</sup>. En los últimos años se han detectado fraudes basados en la falsedad de los datos reflejados en las etiquetas del producto, ya que estas no se corresponden con el contenido de la botella.

Con este objetivo y para llevar a cabo este bloque de experimentos, se prepararon 459 mezclas binarias compuestas por 3 AOVE con DOP (Saqura, Oleoestepa y Duque de Baena), dentro del periodo de consumo preferente, mezclados con 3 AOVE con DOP (Planeta, Señorío de Segura y Quinta Do Vallouto) pero fuera del periodo de consumo preferente, **tabla 19**. Los AOVE que se encontraban fuera de fecha de consumo preferente fueron usados como adulterantes para preparar las muestras. Las muestras adulteradas tenían una concentración en peso de adulterante del 1 al 17 %. Por otra parte, los AOVES (fuera de la fecha de consumo preferente empleados) fueron de distintos orígenes europeos: español, italiano y portugués. En cuanto a la conservación de las botellas y las muestras, se mantuvieron a una temperatura de 21 grados y en oscuridad hasta ser analizadas. Las muestras fueron introducidas en el equipo de medida por medio de una cubeta de cuarzo de 1 cm de paso óptico con las 4 caras pulidas, adecuada para el análisis mediante fluorescencia (*vide supra*).

**Tabla 19.** Características principales de los AOVE utilizados.

AOVE	Variedad	DOP	País	Fecha consumo
Saqura	Picual	Sierra de Segura	España	Dentro de la fecha de consumo preferente
Oleoestepa	Hojiblanca, Arbequina, Manzanilla y Lechín de Sevilla	Estepa	España	
Duque de Baena	Picudo, Lechín, Chorrúo, Hojiblanca y Picual	Baena	España	
Planeta	Noellara del Belice, Biancolilla y Cerasuola	Val Di Mazara	Italia	Fuera de la fecha de consumo preferente
Señorío de Segura	Picual	Sierra de Segura	España	
Quinta do Vallouto	Verdeal, Madural, Cobrançosa y Negrita de Freixo	Tras-os-montes	Portugal	

Cada muestra analizada fue irradiada por un láser continuo UV de 500 mW de potencia con una longitud de onda de emisión de 405 nm. La elección de esta fuente es debida a la longitud de onda donde se produce la absorbanza de numerosos pigmentos presentes en el AOVE (**figura 55**), que conllevan a una emisión significativa<sup>185</sup>.



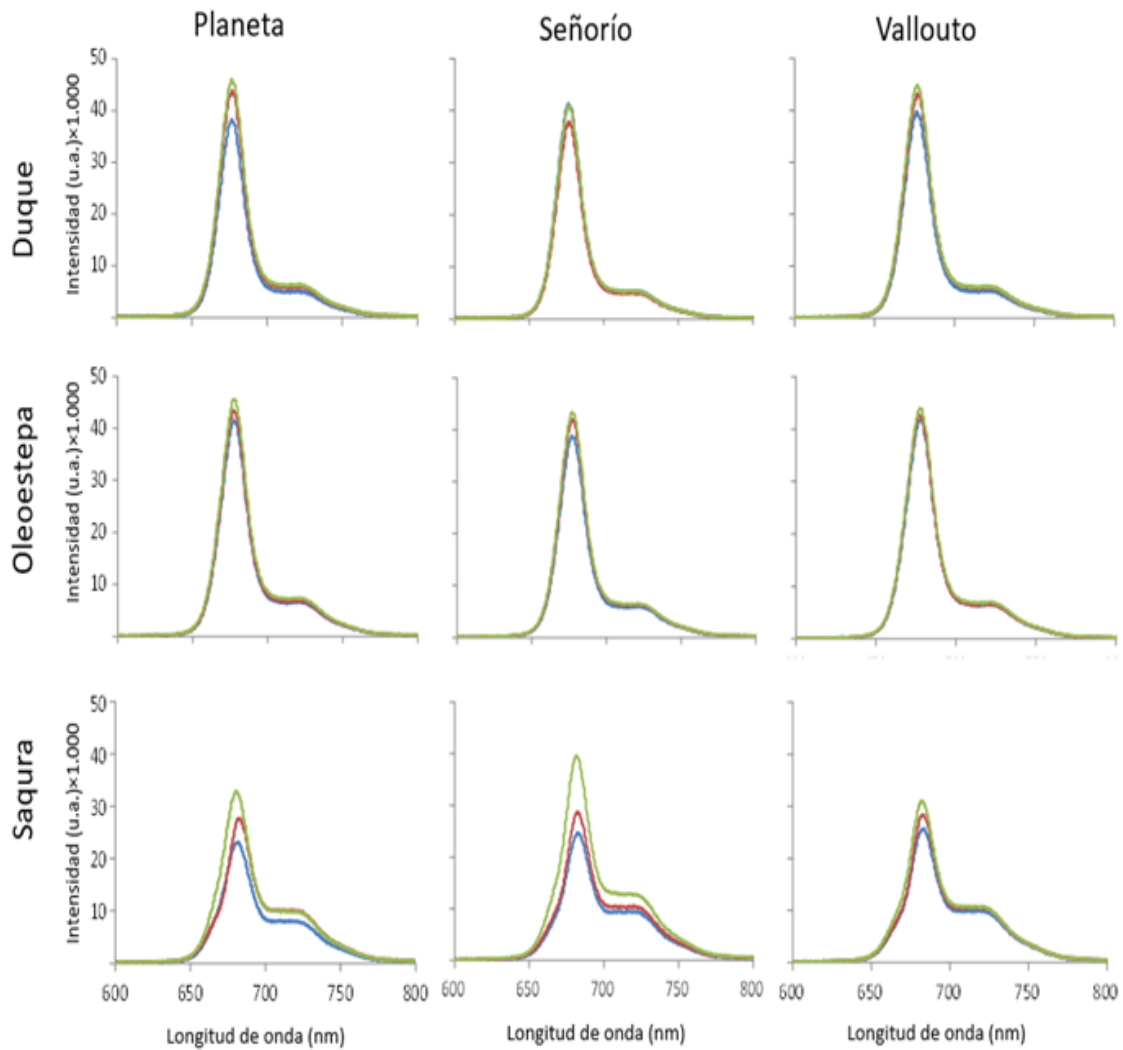
**Figura 55.** Espectro de absorbanza de una muestra de AOVE<sup>190</sup>.

Cuando el haz láser pasa por la muestra, la fluorescencia emitida es recogida mediante un colimador situado a 90° respecto a la fuente emisora. Dicha luz es transportada hasta un espectrómetro mediante una fibra óptica con un núcleo de 200 micras, para posteriormente ser analizada la señal en un ordenador. El espectro obtenido en cada muestra analizada es el resultado de la media de tres mediciones consecutivas. Estas medidas se utilizaron posteriormente para diseñar modelos matemáticos.

Las mezclas binarias preparadas, dieron como resultado la recogida de 1.377 espectros de fluorescencia. Mediante la aplicación de modelos matemáticos, apoyados en parámetros caóticos, se llevó a cabo la estimación de la concentración de adulterante (AOVE DOP fuera de la fecha de consumo preferente) presente en la muestra.

Cabe destacar que debido a las interacciones entre los fluoróforos presentes en las muestras de AOVE puras y adulteradas, las emisiones de fluorescencia exhiben un efecto

de filtro interno<sup>191,192</sup>, que provoca una relación no lineal entre la concentración y la emisión fluorescente<sup>79</sup>. Este efecto causa la reabsorción de la luz emitida por las moléculas previamente excitadas por otras presentes en la muestra. El resultado es una intensidad de emisión sensiblemente más baja, según va en aumento la concentración de fluoróforos (en este caso pigmentos). Esta interferencia dificulta la estimación de la concentración en las muestras binarias, dando pie a la necesidad del uso de herramientas matemáticas para la realización de un análisis más exhaustivo que, junto con la sencillez y rapidez de medida de las muestras (pocos segundos) mediante técnicas fluorescentes, dan como resultado un método atractivo para el análisis de calidad y autenticación de muestras de AOVE<sup>193</sup>. La **figura 56** muestra un ejemplo representativo de las emisiones fluorescentes recogidas durante el análisis de las muestras binarias compuestas por los aceites mostrados en la **tabla 19**.



**Figura 56.** Espectros de emisión correspondientes a mezclas binarias de DOP en fecha con DOP fuera de fecha. Las señales de emisión 1 % corresponden a las líneas de color azul, 8 % al color rojo y 17 % las de color verde <sup>194</sup>.

Como se puede apreciar en la **figura 56**, todas las muestras presentan un máximo de emisión a una longitud de onda de 680 nm, perteneciente a la emisión de varios pigmentos como las clorofilas y carotenoides presentes en el AOVE<sup>185</sup>. Aunque los espectros recogidos van desde longitudes de onda de 350 a 1.050 nm, se ha limitado al intervalo de longitudes de onda más representativo, donde solo se abarca una región del total que cubre las principales diferencias en función de la concentración de adulterante.

Analizando los espectros se puede ver que, a medida que la proporción de adulterante va en aumento en la muestra, la intensidad fluorescente crece pudiéndose pensar que una mayor cantidad de AOVE DOP fuera de fecha significa una mayor presencia de pigmentos,

lo que va en contra del conocimiento sobre la degradación del AOVE<sup>184,195</sup>. Estas señales de mayor emisión están relacionadas con el denominado efecto de filtro interno, que modifica el comportamiento lineal de la fluorescencia.

### **Tratamiento matemático de los datos**

Una vez medidos los espectros de emisión de fluorescencia y distribuidos en las nueve bases de datos, se inicia el análisis estadístico. Dado la complejidad de los espectros de las muestras binarias, es importante preparar estadísticamente las bases de datos para extraer la información oculta que permite la cuantificación de la concentración de adulterantes en cada una de las muestras con el menor error de estimación posible. La información de los espectros se ha dividido en nueve bases de datos, utilizados en el análisis estadístico.

El primer paso del análisis estadístico consiste en localizar los valores atípicos estadísticos. Esta búsqueda atípica se realizó para cada uno de los nueve conjuntos de datos. En estos nueve casos, ningún punto superó tres veces la desviación estándar y por lo tanto, no se eliminó ningún punto de las bases de datos. Seguidamente, se calculan los coeficientes de autocorrelación espectrales (parámetros caóticos). Estas autocorrelaciones se basan en un conjunto de coeficientes para los espectros de emisión fluorescente de longitudes de onda comprendidas entre 350 y 1050 nm<sup>196</sup>. La autocorrelación espectral ( $S_{\Delta\lambda}$ ) se calcula siguiendo la **ecuación 3** (vide supra). Estos parámetros describen la dinámica principal de los sistemas analizados, facilitando la estimación de la concentración de adulterantes en muestras de AOVE. Dada la simplicidad de sus cálculos esto se puede lograr usando una simple calculadora científica. En este caso, los parámetros caóticos y sus análisis estadísticos se llevaron a cabo a través de Microsoft Excel 2013 y Statgraphics Centurion XVIII, respectivamente.

Cada mezcla binaria genera una serie de datos que está compuesto por 20 parámetros caóticos y 51 valores de concentración de adulterantes comprendida entre el 1 y el 17 % en peso. La optimización de los parámetros de cada modelo se lleva a cabo utilizando 50 de 51 muestras, y luego se evalúa el rendimiento del modelo utilizando el último punto de los datos. Este método es conocido como validación cruzada dejando un dato fuera (en inglés "*Leave-one-outcross-validation*"), lo que implica que en cada iteración quede un

dato de verificación y el resto se usa para el entrenamiento. Este proceso de validación se repite hasta que cada muestra se utiliza para validar la herramienta algorítmica (51 pruebas totales por mezcla binaria).

Para seleccionar la combinación adecuada de variables independientes, se diseñaron 262.144 modelos lineales de regresión multiparamétrica con diferentes posibilidades de entrada, **Ec. (4)**. Estos modelos consisten en combinaciones de hasta 9 candidatos potenciales, es decir, modelos estimativos con un máximo de 10 coeficientes. En términos generales, el uso de modelos con variables más independientes conduciría a resultados más precisos. En esta línea, se han calculado diferentes parámetros estadísticos para cada modelo.

$$[\text{Adulterante}] = \beta_0 + \sum_{i=1}^n \beta_i \cdot S_i + \varepsilon \quad (4)$$

En la Ecuación (2), [adulterante] representa la concentración de adulterantes en las mezclas binarias de los AOVE.  $S$ ,  $n$ ,  $\beta$ ,  $\varepsilon$  representan, respectivamente, los coeficientes de autocorrelación, el número de observaciones, los coeficientes del modelo y el error aleatorio.

El proceso de selección se lleva a cabo ponderando valores bajos de MSE, Cp, AIC, HQC, y SBIC así como a altos valores de  $Ra^2$ . Una vez que todos los modelos están diseñados, estos se clasifican del mejor al peor dependiendo de varios parámetros estadísticos: error cuadrático medio (ECM), coeficiente de correlación ajustado ( $Ra^2$ ), Cp de Malva (Cp), criterio de información de Akaike (AIC), Criterio Hannan-Quinn (HQC), y criterio de información bayesiano (BIC), **tabla 20**.

**Tabla 20.** Fórmulas para calcular cada parámetro estadístico utilizado.

Nombre	Fórmula
Error cuadrático medio	$ECM = \frac{1}{n} \sum_i^n (y_i - \hat{y}_i)^2$
Coeficiente de correlación ajustado	$R_a^2 = 1 - \frac{\frac{RSS}{(n - C - 1)}}{\frac{TSS}{(n - 1)}}$
Cp de malva	$C_p = \frac{(RSS + 2 \cdot C \cdot \sigma^2)}{n}$
Criterio de información de Akaike	$AIC = \frac{(RSS + 2 \cdot C \cdot \sigma^2)}{n \cdot \sigma^2}$
Criterio Hannan-Quinn	$HQC = A + n \cdot \log \frac{(RSS)}{n}$ $A = 2 \cdot C \cdot \log(\log(n))$
Criterio de información bayesiano	$SBIC = \frac{(RSS + \log(n) \cdot C \cdot \sigma^2)}{n}$

El ECM representa el cuadrado de la diferencia entre el valor real y el valor estimado.  $R_a^2$  es una correlación entre los valores reales y los valores estimados al considerar el número de coeficientes utilizados. Cp de Malva se utiliza comúnmente para evaluar el ajuste de los modelos de regresión y su potencial. La AIC es similar al parámetro Cp de Mallows, mide la calidad del modelo estadístico. El HQC evalúa el ajuste de un modelo estadístico. El SBIC es un criterio que está estrechamente relacionado con el AIC, utilizado para la selección de modelos. Los valores mínimos Cp, AIC, HQC y SBIC representan el mejor modelo. Los resultados estadísticos obtenidos figuran en la **tabla 21**.

**Tabla 21.** Resultados estadísticos obtenidos para cada una de las mezclas binarias.

Aceites + adulterante	Número VI	ECM	$R_a^2$	$C_p$	AIC	HQC	BIC
Sapura + Vallouto	5	0.87	0.96	-2.99	0.10	1.18	0.33
Sapura + Señorio	5	2.4	0.90	-3.38	1.11	1.18	1.30
Sapura + Planeta	4	2.13	0.92	-3.14	0.95	1.03	1.14
Oleostepa + Vallouto	6	9.67	0.61	2.34	2.54	2.65	2.81
Oleostepa + Señorio	6	4.78	0.81	-1.72	1.84	1.94	2.10
Oleostepa + Planeta	2	8.77	0.64	-9.56	2.29	2.33	2.40
Duque de Baena + Vallouto	5	7.83	0.67	2.91	2.29	2.38	2.52
Duque de Baena + Señorio	6	9.63	0.60	8.63	2.54	2.64	2.81
Duque de Baena + Planeta	1	12.32	0.52	-4.27	2.59	2.62	2.67

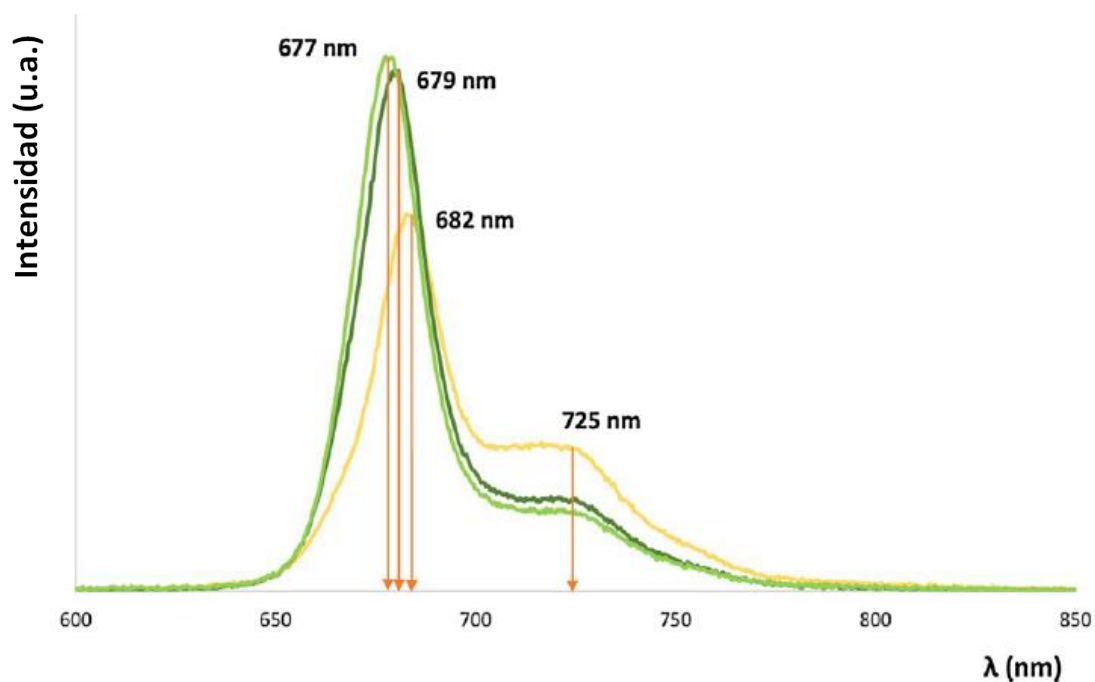
A la luz de los resultados estadísticos que se muestran en la **tabla 21**, la detección y cuantificación de la adulteración del AOVE con DOP Duque de Baena, presenta el peor comportamiento. Por el contrario, la adulteración de Sapura puede ser estimada con elevada precisión. Desde el punto de vista del número de variables independientes utilizadas, la concentración de adulterante en la adulteración realizada con la variedad Planeta es la mejor en todos los casos, ya que se necesitan menos variables para alcanzar resultados comparables. En cuanto al error cuadrático medio (ECM); criterio de información de Akaike (AIC); criterio de Hannan-Quinn (HQC); criterio de información bayesiano (BIC), Vallouto y Señorío son las variedades adulterantes que mejor se pueden detectar en todos los casos. Teniendo en cuenta las variedades de aceitunas de cada DOP y, en concreto, en el caso de Sapura (de España y compuesta únicamente por Picual), la

detección de mezclas fraudulentas es más fácil de detectar si el adulterante procede de diferentes regiones europeas (Italia o Portugal). Por otra parte, el hecho de que las otras DOP contengan mezclas diferentes, puede conducir a una cuantificación más compleja de los adulterantes. En este último caso, la aplicación de un mayor número de muestras sería recomendable para mejorar el rendimiento del modelo y comparar las mezclas entre los AOVE de otras campañas de cosecha.

Asimismo, cabe mencionar que el rango de adulteración cubierto (1-17 %) se encuentra en el lado inferior de lo que, en la práctica, son los fraudes relacionados con la adulteración. En otras palabras, es probable que siempre haya al menos un 10% de adulterante, lo que refuerza la aplicabilidad de las herramientas propuestas, ya que las proporciones más altas de adulterantes serán más fáciles de detectar y cuantificar que las muestras preparadas para esta investigación.

Con los mismos aceites mostrados en la **tabla 19**, se prepararon nuevas muestras binarias que comprendían porcentajes de adulterante del 0,8 % al 18,5 % en peso, originando un total de 254 muestras. La diferencia con respecto al experimento anterior es el tipo de tratamiento matemático dado. En este caso se aplicaron redes neuronales artificiales para poder discernir entre AOVE frescos y fuera de fecha, además de poder cuantificar el adulterante presente en las mezclas binarias. La red neuronal utilizada para llevar a cabo la tarea fue el perceptrón multicapa, una herramienta de estimación no lineal con capacidad para resolver este tipo de problemas<sup>197</sup>.

Cada una de las muestras fue introducida en una cubeta de cuarzo y medida por triplicado previa excitación con un láser UV (405 nm). Todos los espectros de fluorescencia fueron recogidos con un tiempo de integración de 100 ms (tiempo optimizado para todas las muestras). En la **figura 57** y a modo de ejemplo se muestran los tres AOVE DOP frescos.



**Figura 57.** Espectros de fluorescencia pertenecientes a AOVE frescos y puros indicando posiciones de los máximos de emisión. Saquera (amarillo), Oleoestepa (verde oscuro) y Duque de Baena (verde claro) <sup>28</sup>.

Como se puede observar en la **figura 57**, los espectros de emisión son comparables en forma, pero si atendemos a sus máximos de emisión presentan diferencias entre ellos. Si tomamos como referencia al AOVE Duque de Baena, los otros dos aceites se encuentran desplazados a mayores longitudes de onda. Este hecho provoca que la intensidad global sea diferente al igual que las áreas bajo la curva (ABC). Estas diferencias permiten la discriminación entre muestras de AOVE con DOP.

Todos estos datos, permiten el desarrollo de algoritmos matemáticos creados con un doble propósito: crear herramientas capaces de identificar muestras puras (DOP) y poder cuantificar las adulteraciones con AOVE con DOP que estén fuera de la fecha de consumo preferente.

### **Tratamiento matemático**

Para entrenar las redes neuronales, más concretamente MLP, se usaron como variables independientes las áreas bajo la curva (ABC) calculadas de los espectros de las 254 muestras y se utilizaron como variables independientes. Las ABC se obtuvieron de las

áreas comprendidas entre 630-705 nm ( $ABC_1$ ) y 705-800 nm ( $ABC_2$ ). Con respecto al MLP, se optimizaron varios parámetros, y algunas funciones de entrenamiento y transferencia. El número de neuronas ocultas fue optimizado heurísticamente debido al volumen de datos y variables. Se optimizaron varios parámetros ( $L_c$ ,  $L_{cd}$  y  $L_{ci}$ ) y seleccionaron algunas funciones como las de entrenamiento y transferencia para el desarrollo de la red neuronal, **tabla 22**.

**Tabla 22.** Valores de los parámetros optimizados

Función o Parámetro	Selección o Valor optimizado
Función de transferencia	Sigmoidea
Función de entrenamiento	Levenberg-Marquardt
$L_c$	0,5
$L_{cd}$	0,001
$L_{ci}$	2

Si tenemos en cuenta las ABC de las bandas de emisión frente a la concentración de AOVE DOP frescos obtenemos:

**-Saqura:**

$$ABC_1 = -43664 [\text{Saqura}] + 6E+06 ; \quad ABC_2 = -19305 [\text{Saqura}] + 3E+06$$

**- Oleostepa:**

$$ABC_1 = -16205 [\text{Oleostepa}] + 4E+06 ; \quad ABC_2 = -5365.6 [\text{Oleostepa}] + 1E+06$$

**- Duque de Baena:**

$$ABC_1 = -5785.1 [\text{Duque de B.}]^2 + 1E+06 [\text{Duque de B.}] - 4E+07 ;$$

$$ABC_2 = -1595.4 [\text{Duque de B.}]^2 + 282849 [\text{Duque de B.}] - 1E+07$$

Como se puede observar, los valores absolutos de las pendientes correspondientes a las ecuaciones lineales son significativamente diferente. Las pendientes de las ecuaciones que representan la mezclas binarias que contienen Saqura, son mucho más altas que las

de los Oleoestepa (2,7 veces mayor para ABC<sub>1</sub> y 3,6 veces mayor para ABC<sub>2</sub>), lo que sugiere que la adición de la misma cantidad de AOVE Planeta tiene un impacto mucho mayor en los espectros de fluorescencia de Saqura que de Oleoestepa. Este hecho refuerza que el efecto del filtro interno es mayor en Saqura que en Oleoestepa, **figura 57**.

La red neuronal ha sido diseñada para proporcionar una doble respuesta: poder distinguir entre los tres tipos de AOVE frescos y cuantificar el AOVE fresco. Para validar el rendimiento del modelo matemático, se lleva a cabo un proceso de validación interna. Este método se basa en extraer una porción aleatoria de la base de datos (10%) y después optimizar el MLP con los datos restantes. Es una técnica adecuada para determinar la capacidad del modelo. Se llevaron a cabo tres pruebas independientes con distribución de datos aleatoria.

Para la clasificación del AOVE DOP fresco, se ha tenido en cuenta la precisión global (**ecuación 5**), mientras que para evaluar la cuantificación del AOVE DOP fresco se ha utilizado el error de predicción medio (EPM; **ecuación 6**) y el error absoluto medio (EAM; **ecuación 7**).

$$Precisión\ Global = \frac{Aciertos}{N} \cdot 100\ (\%) \quad (5)$$

$$EPM = \frac{1}{N} \sum_{k=1}^N \frac{|r_k - y_k|}{r_k} \cdot 100\ (\%) \quad (6)$$

$$EAM = \frac{1}{N} \sum_{k=1}^N |r_k - y_k| \quad (7)$$

En las ecuaciones, N es el número de muestras evaluadas, r<sub>k</sub> es el valor real de la variable dependiente (salida) y y<sub>k</sub> es el valor dado por el perceptrón para el dato correspondiente a r<sub>k</sub>. Los resultados obtenidos durante las tres validaciones se muestran en la **tabla 23**.

**Tabla 23.** Rendimiento del modelo en las tres validaciones.

Validación interna	AOVE DOP identificado (%)	EPM (%)	EAM (% en peso)
1	100	1,81	1,62
2	100	1,80	1,63
3	100	1,43	1,31
Media	100	1,68	1,52

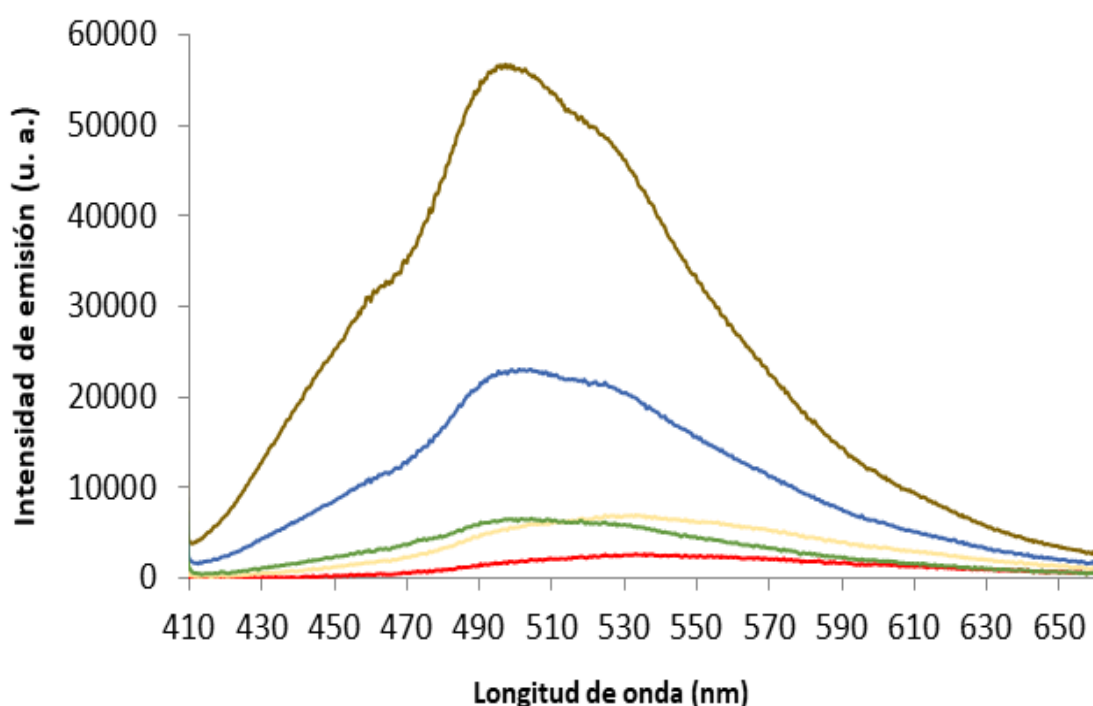
Viendo los resultados obtenidos es lógico que el modelo haya obtenido un 100 % de identificación en los tres tipos de AOVE frescos ya que como muestra la **figura 56**, los espectros de emisión son muy diferentes, lo que da lugar a valores de ABC muy distintos, independientemente del porcentaje de adulterante presente en la muestra. Con respecto a la cuantificación del AOVE fresco, los datos muestran que hay diferencias pequeñas entre los datos estimados por la red y los reales (EPM (1,68 %) y EAM (1,52 % en peso)), esto revela la correlación entre las señales espectroscópicas y la composición de muestras de aceite de oliva. La herramienta basada en el aprendizaje automático que se ha desarrollado puede ser aplicada para autenticar las etiquetas de los AOVE así como para localizar adulteraciones, ayudando en el control de calidad de estos productos y exponiendo actividades fraudulentas. Reforzaría el prestigio de las marcas honorables, y los consumidores se beneficiarían de la implementación de estas herramientas rentables y rápidas, ya que podrían adquirir con confianza auténtica DOP EVOO, libre de fraudes o incluso de compuestos peligrosos. Se puede decir que la unión de la fluorescencia y el perceptrón multicapa son una herramienta válida para evaluar y cuantificar muestras de AOVE con DOP con elevada precisión.

### **3.2.4 Adulteración de vinagre con DOP**

Se prepararon muestras adulteradas de vinagre de Jerez con cuatro vinagres de diferente naturaleza (arroz, sidra, melaza y vino blanco) con el fin de simular las prácticas fraudulentas de vinagres de alta calidad con otros de calidad inferior. Se prepararon un total de 192 muestras que comprendían concentraciones de adulterante del 0 al 15 % en peso con incrementos del 1 % (16 concentraciones x 4 adulterantes x 3 repeticiones). Todas las muestras usadas fueron adquiridas en grandes superficies y se encontraban

dentro de la fecha de caducidad. Las muestras preparadas fueron almacenadas a temperatura ambiente y en oscuridad antes de ser medidas. Al igual que en los experimentos anteriores, las medidas fluorescentes fueron realizadas en el equipo portátil, con diodo láser UV y utilizando cubeta de cuarzo. Los espectros de fluorescencia obtenidos se trataron matemáticamente para poder estimar con la mayor precisión las adulteraciones del vinagre de Jerez.

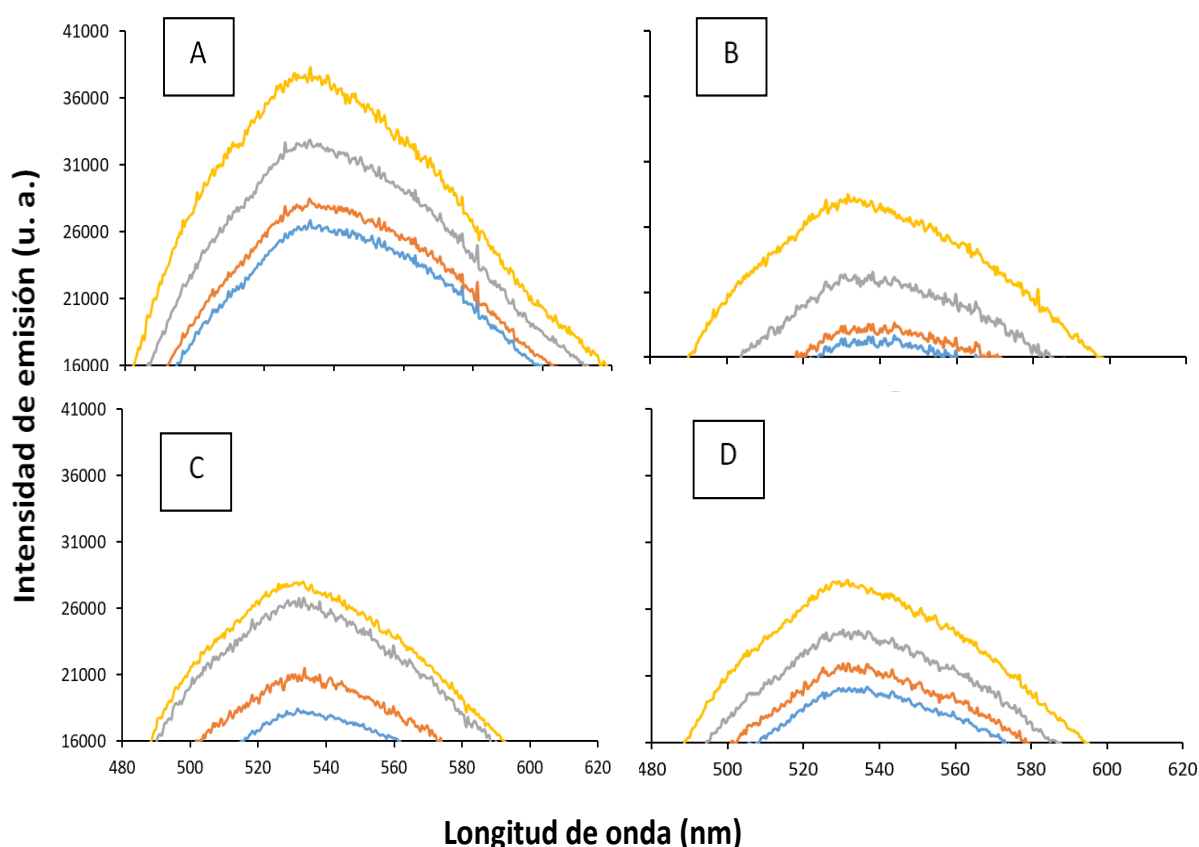
Cada uno de los vinagres usados posee una composición química determinada, dependiendo de las materias primas y del método de elaboración. En su composición podemos destacar la riboflavina, el hidroximetilfurfural, compuestos fenólicos y pigmentos bacterianos, al presentar fluorescencia en el intervalo espectral de estudio. Las muestras analizadas presentan un espectro de emisión característico comprendido entre 450 y 650 nm, que varía en forma e intensidad dependiendo de la proporción de moléculas previamente mencionadas, **figura 58**.



**Figura 58.** Espectros fluorescentes correspondientes a cada uno de los tipos de vinagres utilizados. Vinagre de jerez (rojo); vinagre de melaza (verde); vinagre de arroz (marrón); vinagre de sidra (amarillo); vinagre de vino blanco (azul). Las flechas indican los máximos de emisión.

Como se puede apreciar en la **figura 58**, podemos dividir los vinagres en dos grupos según su máximo de emisión. El primero de ellos englobaría los vinagres que emiten con un máximo cercano de 500 nm (vinagre de arroz, vino blanco y melaza) y el segundo grupo estaría formado por aquellos que presentan un máximo de emisión en torno a 530 nm (vinagre de Jerez y vinagre de sidra). Si nos fijamos en la intensidad de emisión y los colocamos de mayor a menor intensidad quedarían: vinagre de arroz > vino blanco > sidra ≈ melaza > vinagre de Jerez.

Cuando nos fijamos en los espectros de emisión fluorescente de las muestras adulteradas de vinagre de Jerez, podemos ver diferencias en la intensidad según varía la proporción de adulterante, **figura 59**.



**Figura 59.** Espectros de emisión de muestras adulteradas de vinagre de Jerez (azul) en un 2 % (naranja), 8 % (gris) y 15 % (amarillo) en peso con vinagre de arroz (a), vinagre de vino blanco (b) , vinagre de melaza (c) y vinagre de sidra (d).

Fijándonos en la **figura 59** vemos que existe un aumento en la intensidad al aumentar la proporción de adulterante, además del desplazamiento de la banda de emisión hacia el máximo correspondiente a cada adulterante según este va en aumento. Los mayores desplazamientos pertenecen a los vinagres cuyas emisiones máximas se encuentran centradas en 500 nm (vinagre de vino blanco y arroz).

### Tratamiento matemático

Como la información necesaria para diseñar las herramientas matemáticas de clasificación está contenida en los espectros de fluorescencia, el rendimiento de los modelos finales dependerá de cómo se seleccionen o extraigan estos datos antes de ser introducidos. Se han desarrollado cuatro grandes grupos de modelos en relación con las variables independientes empleadas: (i) los máximos de intensidad de los espectros; (ii) las áreas bajo la curva de intensidad; (iii) los valores de intensidad específicos seleccionados por un algoritmo de selección de características basado en filtros llamado Relief-F; (iv) los parámetros caóticos (variables) calculados a partir de los espectros brutos y su posterior selección entre ellos mediante Relief-F.

Para poder cuantificar la presencia de adulterantes en muestras de vinagre de Jerez, se realizó un análisis matemático basado en redes neuronales y parámetros caóticos, recogiendo datos de los espectros de emisión (350-1050 nm). Los 192 espectros de emisión de las diferentes muestras analizadas fueron usados para diseñar cinco modelos diferentes, cuatro para cada uno de los adulterantes y otro para todas las muestras juntas (incluyendo al vinagre de Jerez puro). El rendimiento estadístico de los modelos se ha evaluado a partir de los resultados obtenidos en los procesos de validación y ensayo mediante el error porcentual medio absoluto (MAPE) definido por la **ecuación 8**.

$$MAPE = \frac{1}{N} \sum_{k=1}^N \frac{|r_k - y_k|}{r_k} \times 100 \quad (8)$$

En las **tablas del 24 al 27** se muestran los resultados estadísticos y parámetros de la MLPs optimizados.

**Tabla 24.** Resultados y parámetros estadísticos de las MLPs optimizadas que utilizaron las variables independientes seleccionadas por RF en todo el espectro de fluorescencia.

	Arroz	Vino blanco	Melaza	Sidra	Global
<b>Topología (entrada, NHN, salida)</b>	4, 3, 1	4, 3, 1	4, 3, 1	4, 3, 1	19, 4, 1
<b>Lc</b>	0.25	0.92	0.92	0.25	0.01
<b>Lcd</b>	0.500	0.090	0.670	0.001	0.670
<b>Lci</b>	43.0	2.0	10.0	59.0	26.5
<b>Validación interna (MAPE; %)</b>	5.11	4.21	2.02	24.26	11.23
<b>Validación cruzada (MAPE; %)</b>	6.04	6.48	7.30	23.62	16.96

Como se muestra en la tabla 26, el modelo global ofrece uno de los peores resultados, sólo superado por la MLP de la sidra. Sin embargo, es una opción más versátil, ya que puede cuantificar el vinagre adulterado independientemente de su origen botánico. Aunque algunos de los modelos son estimadores precisos (para arroz, vino blanco y melaza), otros requieren mejoras significativas, por lo que se consideró un segundo enfoque. Con el fin de mejorar los resultados estadísticos, el conjunto inicial de variables utilizadas se redujo para cubrir únicamente la intensidad de emisión para una gama de longitudes de onda entre 450 y 650 nm, que es la región de los espectros en la que se produce la mayor parte de la fluorescencia (**figura 58**). La **tabla 25** muestra un resumen de estos parámetros optimizados y los resultados estadísticos obtenidos.

**Tabla 25.** Resultados estadísticos y parámetros de las MLPs optimizadas que utilizaron las variables independientes seleccionadas por RF de 450 a 650 nm.

	Arroz	Vino blanco	Melaza	Sidra	Global
<b>Topología (entrada, NHN, salida)</b>	4, 3, 1	4, 3, 1	4, 3, 1	4, 3, 1	19, 4, 1
<b>Lc</b>	0.34	0.34	0.84	0.01	0.17
<b>Lcd</b>	0.17	0.17	0.001	0.001	0.084
<b>Lci</b>	2	75.5	75.5	67	59.0
<b>Validación interna (MAPE; %)</b>	2.43	3.39	2.00	8.16	6.48
<b>Validación cruzada (MAPE; %)</b>	6.02	6.08	5.29	8.91	10.93

Se puede apreciar una mejora en términos de rendimiento estadístico (puede verse al comparar las **tablas 24 y 25**). Esto se debe a que la mayoría de los compuestos presentes en el vinagre que emiten luz se encuentran en el rango seleccionado (450 - 650 nm). En este caso, el rendimiento del modelo global mejoró del 11 % y 17 % con respecto a la validación interna y cruzada, (**tabla 24**), a un 6 % y un 11 %, respectivamente (**tabla 25**), lo que representa una mejora sustancial y una herramienta final sólida para evaluar las muestras de vinagre. Sin embargo, en un intento de mejorar aún más estas herramientas de cuantificación de adulterantes, se ha calculado un conjunto de parámetros caóticos seleccionadas por RF para todo el espectro, **tabla 26**.

**Tabla 26.** Resultados estadísticos y parámetros de las MLPs optimizadas que utilizaron las variables caóticas independientes seleccionadas por RF de todo el espectro de fluorescencia.

	Arroz	Vino blanco	Melaza	Sidra	Global
<b>Topología (entrada, NHN, salida)</b>	4, 3, 1	4, 3, 1	4, 3, 1	4, 3, 1	19, 4, 1
<b>Lc</b>	0.41	0.36	0.76	0.12	0.001
<b>Lcd</b>	0.74	0.70	0.17	0.19	0.84
<b>Lci</b>	2.0	80.5	78.4	70.3	92.0
<b>Validación interna (MAPE; %)</b>	3.69	2.89	19.44	7.62	19.67
<b>Validación cruzada (MAPE; %)</b>	6.36	12.83	15.29	8.23	26.07

Cuando se compara con los resultados de la **tabla 24**, se puede observar que algunas de las nuevas MLP caóticas (**tabla 26**) proporcionan mejores resultados, como el vinagre de sidra, pero otras proporcionan peores resultados, incluyendo el vinagre de melaza o el modelo global. Por lo tanto, al considerar todo el rango de los espectros para extraer variables independientes, el uso de parámetros caóticos calculados no está plenamente justificado, ya que los nuevos modelos no parecen conducir a mejores resultados estadísticos. Por último se seleccionaron los parámetros caóticos mediante RF en el rango de 450 a 650 nm para ver si los resultados estadísticos mejoraban, **tabla 27**.

**Tabla 27.** Resultados estadísticos y parámetros de las MLPs optimizadas que utilizaron las variables caóticas independientes seleccionadas por RF de 450 a 650 nm.

	Arroz	Vino blanco	Melaza	Sidra	Global
<b>Topología (entrada, NHN, salida)</b>	4, 3, 1	4, 3, 1	4, 3, 1	4, 3, 1	19, 4, 1
<b>Lc</b>	0.20	0.14	0.40	0.10	1.00
<b>Lcd</b>	0.070	0.150	0.063	0.012	0.001
<b>Lci</b>	2.0	76.5	71.5	63.0	2.0
<b>Validación interna (MAPE; %)</b>					
	1.43	3.09	1.44	3.16	6.86
<b>Validación cruzada (MAPE; %)</b>					
	3.02	2.18	3.42	1.89	7.18

Los resultados generales son mejores que los proporcionados por los modelos basados en información extraída directamente de los espectros de emisión (**tabla 25**). Los cinco modelos revelan un rendimiento superior cuando los parámetros caóticos se utilizan como variables independientes, ya que proporcionan cuantificaciones más precisas de los vinagres adulterados. Para una mejor visualización, en la **tabla 28** se muestran los resultados de los dos tipos de cálculos, los basados en el espectro completo (350-1050 nm) y los basados en las señales valiosas de emisión de las muestras de vinagres (450-650 nm).

**Tabla 28.** Comparación de los resultados estadísticos de las redes neuronales con/sin aplicación de parámetros caóticos en los diferentes intervalos de longitudes de onda.

Parámetros Caóticos	Intervalo de longitudes de onda(nm)	Validación	Arroz	Vino blanco	Melaza	Sidra	Todos
No	450 – 650	Validación interna	2,43	3,39	2,00	8,16	6,48
		Validación cruzada	6,02	6,08	5,29	8,91	10,93
Sí	350 – 1,050	Validación interna	3,69	2,89	19,44	7,62	19,67
		Validación cruzada	6,36	12,83	15,29	8,23	26,07
Sí	450 – 650	Validación interna	1,43	3,09	1,44	3,16	6,86
		Validación cruzada	3,02	2,18	3,42	1,89	7,18

Como puede verse, los resultados mejoraron cuando se utilizaron parámetros caóticos seleccionados en un intervalo de longitud de onda limitado (450 - 650 nm). Los errores relativos se redujeron a menos a la mitad, lo que da una fuerte justificación al enfoque matemático basado en el caos combinado con redes neuronales. Si nos fijamos en la comparativa de los intervalos de longitudes de onda de 350-1050 nm y 450-650 nm, vemos una clara mejora del modelo al estrechar el intervalo de medida. Por lo tanto, se puede confirmar que la combinación de redes neuronales y parámetros caóticos unidos a la posibilidad de medida de las muestras *in situ*, dan como resultado una herramienta capaz de medir y cuantificar muestras adulteradas de vinagre independientemente de su origen botánico.

### 3.3 Comparación láser pulsado y continuo

A la vista de los resultados, se puede apreciar la potencialidad de ambos láseres. El continuo ofrece menos información relativa a la composición de la muestra, pero con un menor requerimiento de conocimientos para apreciar muestras adulteradas tras su combinación con una modelización matemática potente, y el pulsado, que origina espectros LIBS con información característica de los elementos presentes en las muestras. A la hora de comparar costes, la tecnología de láser continuo resulta más barata y ofrece, gracias a la fluorescencia, un gran aliado para caracterizar alimentos. En contrapartida, el láser pulsado, a pesar de ser más caro, ofrece la posibilidad de medir muestras sólidas, líquidas o gaseosas, cosa que con el diodo sería difícil. Con todo esto, se podría decir que, según las necesidades ofertadas, se haría uso de uno u otro láser. En la **tabla 29**, se muestra un resumen de las características que ofrecen uno u otro láser así como sus deficiencias.

**Tabla 29.** Comparativa láser pulsado y continuo.

	Láser pulsado	Láser continuo
<b>Pros</b>	Análisis multielemental	Precio
	Alta potencia	Técnica con alta sensibilidad
	Análisis muestras sol., liq. y gaseosas	Transportable y de fácil manejo
<b>Contras</b>	Precio	Alta sensibilidad a cambios de temperatura
	Mínimo tratamiento de algunas muestras para poder medirse	Baja potencia



CONCLUSIONES



## 4. Conclusiones

En esta Tesis se muestra la potencialidad de la tecnología láser en el control y análisis de la calidad de los alimentos. Esta potencialidad ha sido testada por medio de láseres continuos y pulsados. Por un lado, por medio del láser pulsado, se empleó la técnica LIBS en la caracterización de mieles puras (de diferentes orígenes geográficos) y adulteradas. Los resultados obtenidos mediante el análisis de los metales presentes en las mieles fueron prometedores. En este bloque de experimentos las conclusiones más relevantes serían:

- Dada la elevada energía que se suministraba por unidad de superficie a la muestra en cada uno de los disparos del láser pulsado, la superficie del fluido se veía afectada de manera directa formando irregularidades en forma de vórtices. Es por ello que se optó por congelar las muestras líquidas para intentar medirlas con esta técnica evitando estas anomalías. Esto facilitó la realización de los experimentos, pero los datos del análisis no fueron adecuados.
- Esta técnica es muy sensible a la disposición de cada una de los elementos propios de la técnica (fuente de irradiación, espejos, ángulo y distancia de las lentes colimadoras, etc.). Es por ello que es necesario fijar estas condiciones y no modificarlas a lo largo del bloque experimental.
- El tiempo de retardo en la medida o la energía empleada en cada disparo del láser afecta de manera directa al espectro recogido, pudiendo perderse parte de la información por un mal ajuste de las mismas.
- Dada la complejidad del perfil de los espectros de las muestras de análisis, es necesario tratarlas mediante bases de datos establecidas. En esta Tesis se empleó una base de datos procedente de NIST LIBS. De esta forma se logró una caracterización y un análisis exhaustivo de la muestra.
- La potencialidad del láser sacando información de las muestras analizadas, unido al cálculo de parámetros caóticos para detectar pequeñas variaciones en los espectros, han mostrado ser una herramienta útil en el control y calidad de mieles. En concreto, la unión de los espectros y diferentes herramientas quimiométricas basadas en algoritmos caóticos, dieron como resultado detecciones de mieles adulteradas con sirope de arroz por debajo del 8% en peso.

En lo que respecta al láser continuo, se validó la utilidad de la técnica de fluorescencia mediante el análisis de diferentes alimentos, donde se analizaron mieles, aceites comestibles y vinagres. Al igual que en el bloque anterior, en esta Tesis se muestra la potencialidad del láser continuo en el control y calidad de alimentos. Asimismo, se analizan las ventajas o carencias que ofrecen estas técnicas de laser continuo, con las ventajas ofrecidas por la técnica basada en el láser pulsado de alta energía (LIBS). En el desarrollo de este bloque experimental, son de destacar algunas conclusiones. Éstas se mostraran dependiendo del alimento testado.

En lo que respecta al control de calidad de las mieles, los resultados obtenidos no fueron tan buenos como los obtenidos en el bloque experimental anterior (láser pulsado). En concreto, cabría destacar:

- Además de las condiciones físicas de operación, la repetitividad de los resultados obtenidos son muy dependientes de la estabilidad de la fuente utilizada, es por ello que esta debe de ser controlada periódicamente
- Pequeños cambios en la temperatura de operación ofrecían modificaciones sensibles en la intensidad de la radiación emitida, afectando con ello a la repetitividad de las medidas.
- Los resultados obtenidos y las características del equipo desarrollado en esta Tesis abren una puerta al control de calidad no sólo en el sector apícola, sino también en el caso de otros alimentos y áreas de trabajo.

En el caso del control de calidad del aceite de oliva virgen extra, los resultados obtenidos fueron excelentes, al poder detectarse mezclas de AOVE con otros aceites comestibles de peor calidad o incluso para conocer como varía su espectro según las condiciones de almacenamiento a las que ha estado sometido el aceite una vez producido. Entre las principales conclusiones cabría destacar:

- El efecto de filtro interno presente en las muestras de aceite dio como resultado unas emisiones diferentes a las esperadas en un primer momento. Esta dificultad se pudo solventar aplicando diferentes algoritmos basados en redes neuronales artificiales.

- Los AOVE se conservan mejor en recipientes de cristal oscuro, mejor que en cristal transparente dada la energía que permite pasar a su través. Asimismo los envases plásticos ofrecen mejores garantías que el cristal transparente al permitir un menor paso de la radiación.
- Las mezclas de AOVE con DOP con otros AOVE DOP pero fuera de la fecha establecida como consumo preferente, puede ser detectada mediante fluorescencia basada en láseres continuos, pudiendo detectar mezclas por debajo del 5%.
- Las variables independientes más adecuadas para el control de calidad de los aceites analizados están basadas en el cálculo del área bajo la curva.
- La combinación de parámetros caóticos y redes neuronales artificiales han ofrecido una potencialidad muy buena a la hora de determinar muestras adulteradas o degradadas por las diferentes condiciones de almacenamiento.
- La combinación de datos de fluorescencia y modelos no lineales inteligentes son adecuado para determinar las condiciones de almacenamiento (exposición a la luz y tipo de contenedor) con rendimientos medio estadístico, mediante validación interna, del 91.2%.

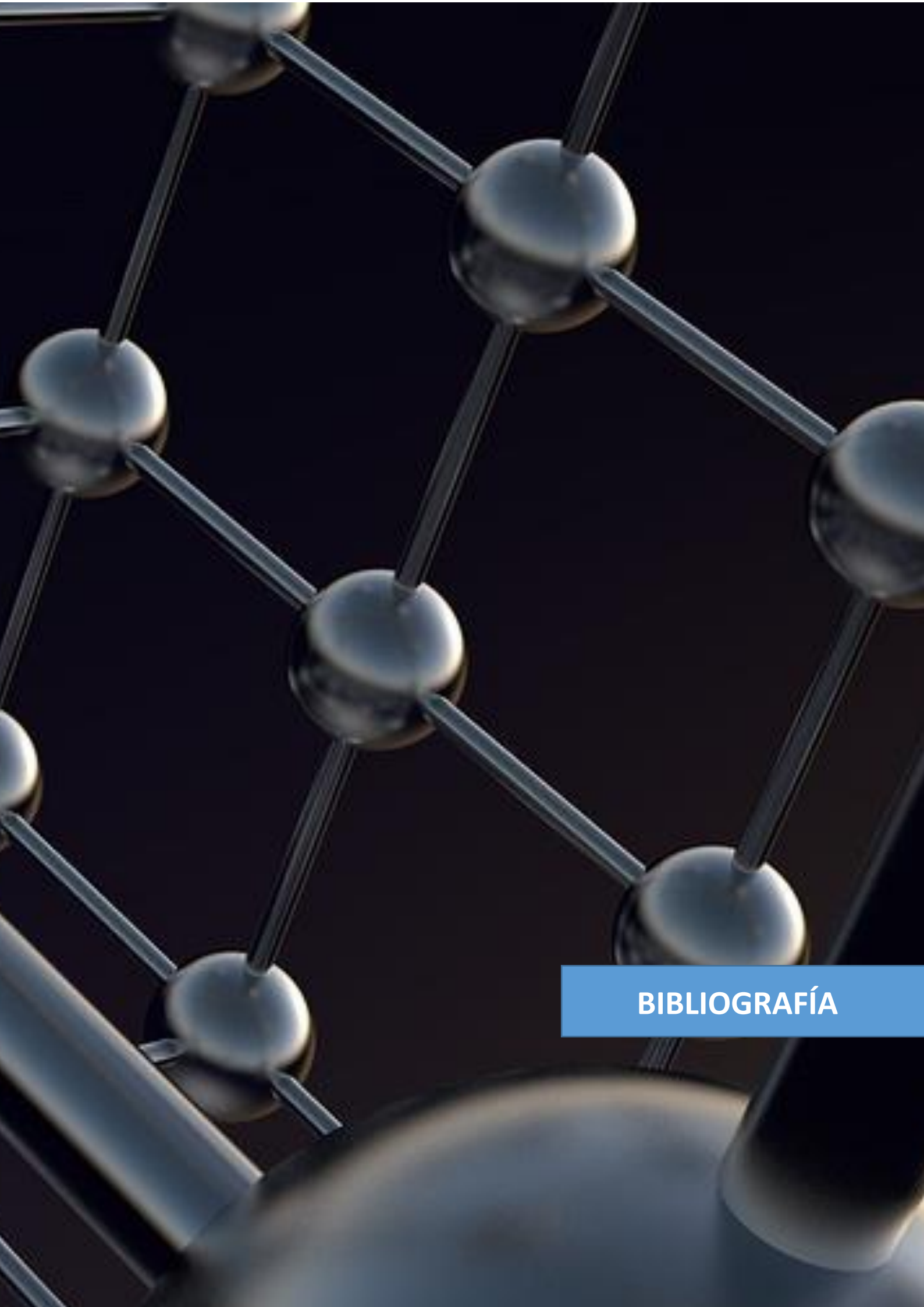
En el caso de los vinagres, se midieron muestras de vinagres con DOP mezcladas con otros vinagres sin DOP y de peor calidad. Las emisiones fluorescentes mostraban en las muestras puras diferencias significativas cuyo máximo de emisión variaba según el vinagre. Las principales conclusiones que se extraen dentro de este alimento serian:

- Según la muestra de vinagre DOP era adulterada con concentraciones crecientes de vinagres de peor calidad, su máximo de emisión se desplazaba hacia el máximo del adulterante utilizado en cada caso. Ofreciendo con ello la posibilidad de detectar su presencia y concentración de forma más precisa que en el resto de los alimentos testados.
- Se encuentran diferencias a la hora de aplicar el tratamiento matemático a todo el intervalo de longitudes de onda de la radiación emitida (350 – 1050 nm) o sólo al intervalo de emisión de las moléculas fluorescentes (450 – 650 nm). Es por ello que ofrecen mejores resultados cuando las herramientas matemáticas aplicadas se centran en el intervalo que acota las moléculas fluorescentes.

- La aplicación de parámetros caóticos (para seleccionar variables) junto con las redes neuronales mostraron ser la mejor combinación a la hora de detectar adulteraciones, obteniendo en algunos casos errores relativos menores del 1,5%, pudiendo detectar mezclas adulteradas por debajo del 5%.

Una vez observados los datos obtenidos por las distintas metodologías usadas para llevar a cabo la experimentación se pueden sacar varias conclusiones. La posibilidad de poder analizar *in situ* las muestras necesarias gracias al diodo láser (laser continuo), facilita todo el proceso de medida ofreciendo posibilidades que previenen la degradación de la muestra y permiten obtener resultados comparables con otras técnicas de medida. El láser pulsado por su parte, permite un conocimiento más profundo de la muestra. Mediante esta técnica, se pueden llegar a determinar elementos traza de algún tipo de residuo u otros alimentos ajenos al producto base.

El objetivo principal que se buscaba era abordar el problema del sector de la alimentación con herramientas capaces de poder determinar la calidad y/o adulteración de una muestra con una alteración mínima o nula a la hora de realizar las medidas. Así pues, queda comprobado la utilidad de los láseres pulsado y continuo para caracterizar alimentos y son herramientas válidas para la detección de adulteraciones de los elementos testados.



## BIBLIOGRAFÍA



## 5. Bibliografía

1. Unión EUROPEA. Reglamento (UE) nº. 1151/2012 del Parlamento Europeo y del Consejo de 21 de noviembre de 2012 sobre los regímenes de calidad de los productos agrícolas y alimenticios. (2012).
2. Trimigno, A., Marincola, F. C., Dellarosa, N., Picone, G. & Laghi, L. Definition of food quality by NMR-based foodomics. *Curr. Opin. Food Sci.* **4**, 99–104 (2015).
3. Slagstad, K. *Healthy foods can compensate for genetic risk.* (2018).
4. Márquez Castro, E. *Marketing Agroalimentario.* (FCA UNAM, 2017).
5. Rodríguez, A. E. Evolución de las Almazaras. Cuadernos de los Amigos de los Museos de Osuna. **12**, 18–24 (2010).
6. Aguado Alonso, J. & Rodríguez Somolinos, F. *Ingeniería de la industria alimentaria.* (1999).
7. Ahmad, A. N., Ungku Zainal Abidin, U. F., Othman, M. & Abdul Rahman, R. Overview of the halal food control system in Malaysia. *Food Control* **90**, 352–363 (2018).
8. Bourges, L., González Acebes, B. & Muñiz Espada, E. Seguridad alimentaria: dificultades y oportunidades. *Revista de derecho agrario y alimentario* **30**, 7–32 (2014).
9. Torrecilla, J. S., García, J., García, S. & Rodríguez, F. Quantification of adulterant agents in extra virgin olive oil by models based on its thermophysical properties. *J. Food Eng.* **103**, 211–218 (2011).
10. Naila, A., Flint, S. H., Sulaiman, A. Z., Ajit, A. & Weeds, Z. Classical and novel approaches to the analysis of honey and detection of adulterants. *Food Control* **90**, 152–165 (2018).
11. Bocková, J., Marín Roldán, A., Yu, J. & Veis, P. Potential use of surface-assisted LIBS for determination of strontium in wines. *Appl. Opt.* **57**, 8272–8278 (2018).
12. Qin, J. *et al.* Detection and quantification of adulterants in milk powder using a high-throughput Raman chemical imaging technique. *Food Addit. Contam.* **34**, 152–161 (2017).
13. Arrieta-Almario, A. A., Palencia-Luna, M. S. & Arrieta-Torres, P. L. Determination of adulterant in milk through the use of a portable voltammetric electronic tongue. *Rev. Mex. Ing. Quim.* **17**, 877–884 (2018).
14. Aroca-Santos, R., Cancilla, J. C., Pérez-Pérez, A., Moral, A. & Torrecilla, J. S. Quantifying binary and ternary mixtures of monovarietal extra virgin olive oils with UV–vis absorption and chemometrics. *Sensors Actuators B Chem.* **234**, 115–121 (2016).
15. FAO & UNIÓN EUROPEA. La Seguridad Alimentaria: información para la toma de decisiones. 4 (2011).
16. Pedraza, D. F. Medición de la seguridad alimentaria y nutricional. *RESPYN Rev. Salud Pública y Nutr.* **6**, (2005).
17. Usuki, F. & Tohyama, S. Three Case Reports of Successful Vibration Therapy of the Plantar Fascia for Spasticity Due to Cerebral Palsy-Like Syndrome, Fetal-Type Minamata Disease. *Medicine (Baltimore).* **95**, e3385 (2016).
18. Gelpí, E. *et al.* The spanish toxic oil syndrome 20 years after its onset: A multidisciplinary review of scientific knowledge. *Environ. Health Perspect.* **110**, 457–464 (2002).
19. Telfer, B. Mad cow disease detected in Scotland. *Aust. Vet. J.* **96**, N2–N2

20. Briz Escribano, J. & Boente, I. de F. Consumo y Seguridad Alimentaria. Evolución y Tendencias. 119–130 (2008).
21. García, B. E. *et al.* La alergia alimentaria en el siglo XXI. *An. Sist. Sanit. Navar.* **26**, 07–15 (2003).
22. Capelluto, M. F. Adulteración y falsificación de alimentos y los consiguientes riesgos para la salud. *Rev. Iberoam. Derecho Ambient. y Recur. Nat.* (2015).
23. Ye, Y., Guo, H. & Sun, X. Recent progress on cell-based biosensors for analysis of food safety and quality control. *Biosens. Bioelectron.* **126**, 389–404 (2019).
24. Li, T., Lin, H., Zhang, H., Svanberg, K. & Svanberg, S. Application of Tunable Diode Laser Spectroscopy for the Assessment of Food Quality. *Appl. Spectrosc.* **71**, 929–938 (2017).
25. Qin, J. *et al.* Line-scan Raman imaging and spectroscopy platform for surface and subsurface evaluation of food safety and quality. *J. Food Eng.* **198**, 17–27 (2017).
26. Aroca-Santos, R., Lastra-Mejías, M., Cancilla, J. C. & Torrecilla, J. S. Intelligent modelling to monitor the evolution of quality of extra virgin olive oil in simulated distribution conditions. *Biosyst. Eng.* **172**, 49–56 (2018).
27. Lastra-Mejías, M. *et al.* Characterization of an array of honeys of different types and botanical origins through fluorescence emission based on LEDs. *Talanta* **185**, 196–202 (2018).
28. Torreblanca-zanca, A., Aroca-santos, R., Lastra-Mejías, M. & Izquierdo, M. Laser diode induced excitation of PDO extra virgin olive oils for cognitive authentication and fraud detection. *Sensors Actuators B. Chem.* **280**, 1–9 (2019).
29. Temiz, H. T., Sezer, B., Berkkan, A., Tamer, U. & Boyaci, I. H. Assessment of laser induced breakdown spectroscopy as a tool for analysis of butter adulteration. *J. Food Compos. Anal.* **67**, 48–54 (2018).
30. Abrar, M. *et al.* Determination of hazardous ingredients in personal care products using laser-induced breakdown spectroscopy. *Laser Phys.* **28**, 056002 (2018).
31. Yang, P. *et al.* Analytical-performance improvement of laser-induced breakdown spectroscopy for the processing degree of wheat flour using a continuous wavelet transform. *Appl. Opt.* **57**, 3730 (2018).
32. Sánchez-Martín, A. *et al.* Adulteración de leches infantiles con melamina en China. *Gac. Médica Bilbao* **115**, 123–131
33. GONZÁLEZ VAQUÉ, L. La prevención y represión de los fraudes alimentarios en la Unión Europea. *Rev. CESCO Derecho Consum.* **0**, 125–142 (2015).
34. Moore, J. C., Spink, J. & Lipp, M. Development and Application of a Database of Food Ingredient Fraud and Economically Motivated Adulteration from 1980 to 2010. *J. Food Sci.* **77**, (2012).
35. *Informe sobre la crisis alimentaria, los fraudes en la cadena alimentaria y el control al respecto.* Comisión de Medio Ambiente, Salud Pública y Seguridad Alimentaria (2013).
36. Huang, J. *et al.* Gas exchange in fruits related to skin condition and fruit ripening studied with diode laser spectroscopy. *J. Biomed. Opt.* **21**, 127007 (2016).
37. Diario oficial de la Unión Europea. Reglamento (UE) No 1169/2011 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 25 de octubre de 2011, sobre la información alimentaria facilitada al consumidor.
38. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Available at: <https://www.mapa.gob.es/es/>. (Accessed: 3rd September 2019)

39. Christian, G. D. *Química analítica*. (McGraw-Hill/Interamericana, 2009).
40. Miller, J. N. & Miller, J. C. *Estadística y quimiometría para química analítica*. (Pearson Educacion, 2002).
41. Shampo, M., Kyle, R. A. & Steensma, D. P. Aleksandr Prokhorov—Lasers and Masers. *Mayo Clin. Proc.* **86**, e33 (2011).
42. Alonso Fernández, B., Borrego Varillas, R., Hernández García, C., Pérez Hernández, J. A. & Romero Vázquez, C. *El láser la luz de nuestro tiempo*. (Llucmajor: Globalia, 2010).
43. Li, M. *et al.* Amplified Spontaneous Emission Based on 2D Ruddlesden-Popper Perovskites. *Adv. Funct. Mater.* **28**, 1707006 (2018).
44. Lutsenko, E. V. *et al.* Investigation of Photoluminescence, Stimulated Emission, Photoreflectance, and 2DEG Properties of Double Heterojunction AlGaIn/GaN/AlGaIn HEMT Heterostructures Grown by Ammonia MBE. *Phys. Status Solidi A-Applications Mater. Sci.* **215**, 1700602 (2018).
45. Schawlow, A. L. & Townes, C. H. Infrared and Optical Masers. *Phys. Rev.* **112**, 1940–1949 (1958).
46. MAIMAN, T. H. Stimulated Optical Radiation in Ruby. *Nature* **187**, 493–494 (1960).
47. García González, J. E. & Martínez Rodríguez, F. de la C. El láser¿ motivación o realidad para el estudio de Física por los estudiantes de las Ciencias para la Salud? *Rev. Cuba. Investig. Biomédicas* **25**, 0–0 (2006).
48. Javan, A., Bennett, W. R. & Herriott, D. R. Population Inversion and Continuous Optical Maser Oscillation in a Gas Discharge Containing a He-Ne Mixture. *Phys. Rev. Lett.* **6**, 106–110 (1961).
49. Holonyak, N. & Bevacqua, S. F. COHERENT (VISIBLE) LIGHT EMISSION FROM Ga(As<sub>1-x</sub>P<sub>x</sub>) JUNCTIONS. *Appl. Phys. Lett.* **1**, 82–83 (1962).
50. Kales, D. & Gould, G. Laser pioneer completes 30-year odyssey for his patents. *LASER Focus.* **24**, (1988).
51. Yang, Y., Yang, S., Li, C. & Lin, X. Passively Q-switched and mode-locked Tm-Ho co-doped fiber laser using a WS<sub>2</sub> saturable absorber fabricated by chemical vapor deposition. *Opt. Laser Technol.* **111**, 571–574 (2019).
52. Haus, H. A. Mode-locking of lasers. *IEEE J. Sel. Top. Quantum Electron.* **6**, 1173–1185 (2000).
53. Larotonda, M. A. *Láser de Nd: YAG con mode-locking por lente de Kerr bombeado por diodos*. (Universidad de Buenos Aires, 2002).
54. Patel, C. K. N. Continuous-Wave Laser Action on Vibrational-Rotational Transitions of C<sub>2</sub>O. *Phys. Rev.* **136**, A1187–A1193 (1964).
55. Bhattacharjya, D. *et al.* Fast and controllable reduction of graphene oxide by low-cost CO<sub>2</sub> laser for supercapacitor application. *Appl. Surf. Sci.* **462**, 353–361 (2018).
56. Sullivan, A. & Houldcroft, P. Gas-Jet laser cutting. *Br. Weld. J.* 443–+ (1967).
57. Tecnología láser: Aplicación industrial y automatización - Movicontrol. Available at: <https://movicontrol.es/laser-industrial-y-automatizacion/>. (Accessed: 25th August 2019)
58. Vázquez Alba, D. & Carballido Rodríguez, J. Fundamentos del láser y su aplicación en urología. *Arch. Españoles Urol. (Ed. impresa)* **61**, 965–970 (2008).
59. Bilmes, G. M. *Láser*. (Ediciones Colihue, 1992).
60. Valenzuela, V. M., Hernández, L. & Gomez, E. High power rapidly tunable system for laser cooling. *Rev. Sci. Instrum.* **83**, 015111 (2012).

61. McConnell, G. *et al.* Organic Semiconductor Laser Platform for the Detection of DNA by AgNP Plasmonic Enhancement. *Langmuir* **34**, 14766–14773 (2018).
62. Nitta, M. *et al.* Role of photodynamic therapy using talaporfin sodium and a semiconductor laser in patients with newly diagnosed glioblastoma. *J. Neurosurg.* 1–8 (2018). doi:10.3171/2018.7.JNS18422
63. Fernández-Rañada, A. *Física básica*. (Alianza, 1997).
64. Malacara, D. *Óptica básica (3a. ed.)*. (FCE - Fondo de Cultura Económica, 2015).
65. Yuste Llandres, M. & Carreras Béjar, C. *Fundamentos de la radiación laser*. (UNED, 1992).
66. Csele, M. *Fundamentals of Light Sources and Lasers*. (John Wiley & Sons, 2004). doi:10.1002/0471675210
67. Aguirre Pastor, M. Á. Avances en la preparación de muestras líquidas para análisis elemental con técnicas espectrométricas basadas en plasma: ICP-OES, ICP-MS y LIBS. (Universidad de Alicante, 2015).
68. Barboza, N., Ríos, L. & Cudney, R. Láser de alta potencia y alta eficiencia bombeado por diodo. *Rev. Mex. física* **56**, 489–496 (2010).
69. Jara Cayturo, F. Espectroscopia de emisión óptica de plasma inducido por láser (LIBS) para el análisis del carbón mineral. ( UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERÍA. Lima.(Perú), 2016).
70. Koechner, W. *Solid-State Laser Engineering - 6th Edition*. Springer (2014). doi:10.1007/s13398-014-0173-7.2
71. Barros, V. & VG Villaescusa. Puntos cuanticos: nueva aportacion de la nanotecnologia en investigacion y medicina. *Rev. Complut. Ciencias Vet.* **5**, 69–102 (2011).
72. Faist, J. *et al.* Quantum cascade laser: Temperature dependence of the performance characteristics and high  $T_0$  operation. *Appl. Phys. Lett.* **65**, 2901–2903 (1994).
73. Endo, M. & Walter, R. *Gas lasers*. (CRC Press , 2016). doi:https://doi.org/10.1201/b13628
74. Alcántara-González, J. *et al.* Hemangiomas infantiles tratados con aplicación secuencial de láser de colorante pulsado y Nd:YAG: estudio retrospectivo. *Actas Dermosifiliogr.* **104**, 504–511 (2013).
75. Stock Silberman, R. P. Espectrofluorimetría. (2006).
76. Skoog, D., Holler, F. J. & Stanley R. Crocu. *Principios de análisis instrumental*. Cengage learning **6**, (2008).
77. Lastra-Mejías, M. *et al.* Chaotic parameters from fluorescence spectra to resolve fraudulent mixtures of fresh and expired protected designation of origin extra virgin olive oils. *Talanta* **195**, 1–7 (2019).
78. Izquierdo, M. *et al.* Chaotic parameters extracted from fluorescence spectra to quantify sheep cheese whey in natural bodies of water. *Talanta* **190**, 269–277 (2018).
79. Cancilla, J. C., Díaz-Rodríguez, P., Izquierdo, J. G., Bañares, L. & Torrecilla, J. S. Artificial neural networks applied to fluorescence studies for accurate determination of N-butylpyridinium chloride concentration in aqueous solution. *Sensors Actuators B Chem.* **198**, 173–179 (2014).
80. Cabriales Gómez, R. Luminiscencia en polímeros semiconductores. *Ingenierias* **7**, 12–16 (2004).

81. Beiser, A. *Física aplicada*. (McGraw-Hill, 2011).
82. Musazzi, S. & Perini, U. *Laser-Induced Breakdown Spectroscopy*. **182**, (Springer Berlin Heidelberg, 2014).
83. Miziolek, A., Palleschi, V. & Schechter, I. *Laser induced breakdown spectroscopy*. (Cambridge university press, 2006).
84. Zavaleta-de la Huerta, D., España-Tost, A. J., Berini-Aytés, L. & Gay-Escoda, C. Aplicaciones del láser Nd: YAG en Odontología. *RCOE* **9**, 539–545 (2004).
85. Ormachea Muñoz, O. & Delgado Borda, M. DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DE UN LÁSER PULSADO PORTÁTIL DEL TIPO YAG:Nd+++ PARA APLICACIONES LIBS. *Investig. Desarro.* **11**, 161–173 (2011).
86. Guo, L. B. *et al.* Accuracy improvement of quantitative analysis by spatial confinement in laser-induced breakdown spectroscopy. *Opt. Express* **52**, 405102 (2013).
87. Ding, Y., Xia, G., Ji, H. & Xiong, X. Accurate quantitative determination of heavy metals in oily soil by laser induced breakdown spectroscopy (LIBS) combined with interval partial least squares (IPLS). *Anal. Methods* **11**, 3657–3664 (2019).
88. Qiao, S., Ding, Y., Tian, D., Yao, L. & Yang, G. A Review of Laser-Induced Breakdown Spectroscopy for Analysis of Geological Materials. *Appl. Spectrosc. Rev.* **50**, 1–26 (2015).
89. Al Balah, O. & Aied Taha Nassef, O. A Further Analysis of Laser Induced Breakdown Spectroscopy Ink Pens' Spectra Using Principal Component Analysis (PCA) for Forensic Characterization. *Arab J. Nucl. Sci. Appl.* **52**, 72–78 (2019).
90. Yang, J.-H. & Yoh, J. J. Forensic Discrimination of Latent Fingerprints Using Laser-Induced Breakdown Spectroscopy (LIBS) and Chemometric Approaches. *Appl. Spectrosc.* **72**, 1047–1056 (2018).
91. Fortés Román, F. J. Técnicas láser para el análisis y diagnóstico de bienes de interés patrimonial: estudio de materiales de la Catedral de Málaga y de colecciones del Museo Arqueológico Provincial. (Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga, 2007).
92. Wang, Q., Teng, G., Li, C., Zhao, Y. & Peng, Z. Identification and classification of explosives using semi-supervised learning and laser-induced breakdown spectroscopy. *J. Hazard. Mater.* **369**, 423–429 (2019).
93. Knight, A. K., Scherbarth, N. L., Cremers, D. A. & Ferris, M. J. Characterization of Laser-Induced Breakdown Spectroscopy (LIBS) for Application to Space Exploration. *Appl. Spectrosc.* **54**, 331–340 (2000).
94. Brennetot, R. *et al.* Mars Analysis by Laser-Induced Breakdown Spectroscopy (MALIS): Influence of Mars Atmosphere on Plasma Emission and Study of Factors Influencing Plasma Emission with the Use of Doehlert Designs. *Appl. Spectrosc.* **57**, 744–752 (2003).
95. Cremers, D. A. & Radziemski, L. J. *Handbook of Laser-Induced Breakdown Spectroscopy*. (Wiley-Blackwell, 2013). doi:10.1002/9781118567371
96. Alvira, F. C. Espectroscopía de Plasmas Inducidos por Láser (LIBS) aplicada a la caracterización de piezas únicas y productos de interés industrial. (Facultad de Ciencias Exactas. La plata (Argentina), 2010).
97. Guirado Gutiérrez, S. Tecnología LIBS Subacuática. Investigación, Desarrollo y Aplicación al Estudio de Materiales Arqueológicos Sumergidos. (Servicio de Publicaciones y Divulgación Científica, 2015).

98. Fiorucci, M. P. Aplicación de la ablación mediante láser pulsado de nanosegundo a la limpieza y texturizado de materiales. (Universidad de Coruña. , 2015).
99. Arrowsmith, P. Laser ablation of solids for elemental analysis by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Anal. Chem.* **59**, 1437–1444 (1987).
100. Russo, R. E., Mao, X., Liu, H., Gonzalez, J. & Mao, S. S. Laser ablation in analytical chemistry—a review. *Talanta* **57**, 425–451 (2002).
101. Srinivasan, R. & Braren, B. Ultraviolet laser ablation of organic polymers. *Chem. Rev.* **89**, 1303–1316 (1989).
102. Nolte, S. *et al.* Ablation of metals by ultrashort laser pulses. *J. Opt. Soc. Am. B* **14**, 2716–2722 (1997).
103. Morales, A. M. & Lieber, C. M. A laser ablation method for the synthesis of crystalline semiconductor nanowires. *Sci.* **279**, 208–211 (1998).
104. Gamaly, E. G., Rode, A. V., Luther-Davies, B. & Tikhonchuk, V. T. Ablation of solids by femtosecond lasers: Ablation mechanism and ablation thresholds for metals and dielectrics. *Phys. Plasmas* **9**, 949–957 (2002).
105. Amoruso, S., Bruzzese, R., Spinelli, N. & Velotta, R. Characterization of laser-ablation plasmas. *J. Phys. B At. Mol. Opt. Phys.* **32**, R131–R172 (1999).
106. Vilaseca Alavedra, R. El láser, fuente de fenómenos y dinámicas no lineales. *Revista española de física* **24**, 23–29 (2010).
107. Zhang, T., Tang, H. & Li, H. Chemometrics in laser-induced breakdown spectroscopy. *J. Chemom.* **32**, e2983 (2018).
108. Roh, S.-B., Park, S.-B., Oh, S.-K., Park, E.-K. & Choi, W. Z. Development of intelligent sorting system realized with the aid of laser-induced breakdown spectroscopy and hybrid preprocessing algorithm-based radial basis function neural networks for recycling black plastic wastes. *J. Mater. Cycles Waste Manag.* **20**, 1934–1949 (2018).
109. Cunningham, P. & Delany, S.-. k-Nearest neighbour classifiers. *Mult. Classif. Syst.* **34**, 1–17 (2007).
110. Abu Alfeilat, H. A. *et al.* Effects of Distance Measure Choice on K-Nearest Neighbor Classifier Performance: A Review. *Big Data* (2019). doi:10.1089/big.2018.0175
111. Rodríguez Jaume, M. J. & Mora Catalá, R. *Estadística informática : casos y ejemplos con el SPSS.* (Universidad de Alicante. Servicio de publicaciones., 2001).
112. Nedic, V., Despotovic, D., Cvetanovic, S., Despotovic, M. & Babic, S. Comparison of classical statistical methods and artificial neural network in traffic noise prediction. *Environ. Impact Assess. Rev.* **49**, 24–30 (2014).
113. López, R. & Fernandez, J. *Las redes neuronales artificiales. Fundamentos teoricos y aplicaciones practicas.* (NETBIBLO, 2008).
114. Torrecilla, J. S., Cancilla, J. C., Matute, G., Díaz-Rodríguez, P. & Flores, A. I. Self-organizing maps based on chaotic parameters to detect adulterations of extra virgin olive oil with inferior edible oils. *J. Food Eng.* **118**, 400–405 (2013).
115. Ding, Z., Lu, Z. & Liu, J. Parameters identification of chaotic systems based on artificial bee colony algorithm combined with cuckoo search strategy. *Sci. China Technol. Sci.* **61**, 417–426 (2018).
116. Lajara Vizcaíno, J. R. & Pelegrí Sebastiá, J. *LabVIEW: entorno gráfico de programación.* (Marcombo, 2011).
117. Graff, J. La evolución de Labview: décadas de desarrollo. *Instrum. Newsl.* **21**, 3–27 (2009).

118. National Instruments. LabVIEW. User manual. 514 (1996).
119. National Instruments. LabVIEW. User manual. 349 (2003).
120. Del Rio, J., Manuel, A., Sarria, D. & Shariat, S. *Labview: Programación para sistemas de instrumentación*. (Ibergarceta Publicaciones SL, 2011).
121. Beussman, D. J. & Walters, J. P. Complete LabVIEW-Controlled HPLC Lab: An Advanced Undergraduate Experience. *J. Chem. Educ.* **94**, 1527–1532 (2017).
122. Hussain, M. & Imran, T. Design and characterization simulation of Ti: Sapphire-based femtosecond laser system using Lab2 tools in the NI LabVIEW. *Microw. Opt. Technol. Lett.* **60**, 1732–1737 (2018).
123. Imran, T. & Hussain, M. An overview of LabVIEW-based f-to-2f spectral interferometer for monitoring, data acquiring and stabilizing the slow variations in carrier-envelope phase of amplified femtosecond laser pulses. *Optik (Stuttg)*. **157**, 1177–1185 (2018).
124. Robles-Algarín, C., Caputo-Llanos, R. & Sánchez-Hernández, A. Sistema Scada basado en Labview para la supervisión y el control de los procesos de coagulación y floculación de una planta de tratamiento de agua. *Prospect* **10**, 44–52 (2012).
125. Han, M. & Su, Y. A LabVIEW-based control system design for femtosecond laser micro-nano fabrication processing. in *2016 IEEE 11th Conference on Industrial Electronics and Applications (ICIEA)* 203–208 (IEEE, 2016). doi:10.1109/ICIEA.2016.7603578
126. Costa-Castelló, R. *et al.* Integración de dispositivos físicos en un laboratorio remoto de control mediante diferentes plataformas: Labview, Matlab y C/C++. *Rev. Iberoam. Automática e Informática Ind. RIAI* **7**, 23–34 (2010).
127. Vasilescu, I. *et al.* Determination of the antiradical properties of olive oils using an electrochemical method based on DPPH radical. *Food Chem.* **166**, 324–329 (2015).
128. Aroca-Santos, R., Cancilla, J. C., Matute, G. & Torrecilla, J. S. Identifying and Quantifying Adulterants in Extra Virgin Olive Oil of the Picual Varietal by Absorption Spectroscopy and Nonlinear Modeling. *J. Agric. Food Chem.* **63**, 5646–5652 (2015).
129. Criado-Navarro, I., Mena-Bravo, A., Calderón-Santiago, M. & Priego-Capote, F. Determination of glycerophospholipids in vegetable edible oils: Proof of concept to discriminate olive oil categories. *Food Chem.* **299**, 125136 (2019).
130. Aparicio, R. & Aparicio-Ruíz, R. Authentication of vegetable oils by chromatographic techniques. *J. Chromatogr. A* **881**, 93–104 (2000).
131. Martínez Álvarez, J. R. *et al.* *El aceite de oliva y la dieta mediterránea. Nutrición y salud* (Nueva Imprenta S.A., 2005).
132. Vera, D. N., Jiménez-Carvelo, A. M., Cuadros-Rodríguez, L., Ruisánchez, I. & Callao, M. P. Authentication of the geographical origin of extra-virgin olive oil of the Arbequina cultivar by chromatographic fingerprinting and chemometrics. *Talanta* **203**, 194–202 (2019).
133. Di Stefano, V. & Melilli, M. G. Effect of storage on quality parameters and phenolic content of Italian extra-virgin olive oils. *Nat. Prod. Res.* 1–9 (2019). doi:10.1080/14786419.2019.1587434
134. Pristouri, G., Badeka, A. & Kontominas, M. G. Effect of packaging material headspace, oxygen and light transmission, temperature and storage time on quality characteristics of extra virgin olive oil. *Food Control* **21**, 412–418 (2010).
135. Talio, M. C., Muñoz, V., Acosta, M. & Fernández, L. P. Determination of lead traces in honey using a fluorimetric method. *Food Chem.* **298**, 125049 (2019).

136. Jean-Prost, P. *Apicultura : conocimiento de la abeja, manejo de la colmena*. (S.A. MUNDI-PRENSA LIBROS , 2007).
137. Schneiter, E., Haag, M. & Yurkiv, G. Miel: Beneficios, propiedades y usos. 15 (2015).
138. Merino, A. *Elaboración de Toffee de miel y Avellana chilena-(Gevuina avellana Mol.)*. (Universidad Austral de Chile, 2003).
139. Ministerio de agricultura, alimentación y medio ambiente. Programa nacional de medidas de ayuda a la apicultura. 130 (2016).
140. ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACIÓN. Codex Alimentarius. Proyecto de norma revisado para la miel. 1–38 (1999).
141. Nagai, T., Kai, N., Tanoue, Y. & Suzuki, N. Chemical properties of commercially available honey species and the functional properties of caramelization and Maillard reaction products derived from these honey species. *J. Food Sci. Technol.* **55**, 586–597 (2018).
142. Hellwig, M., Rückriemen, J., Sandner, D. & Henle, T. Unique Pattern of Protein-Bound Maillard Reaction Products in Manuka ( *Leptospermum scoparium* ) Honey. *J. Agric. Food Chem.* **65**, 3532–3540 (2017).
143. Morales, V., Sanz, M. L., Martín-Álvarez, P. J. & Corzo, N. Combined use of HMF and furosine to assess fresh honey quality. *J. Sci. Food Agric.* **89**, 1332–1338 (2009).
144. Fallico, B., Zappalà, M., Arena, E. & Verzera, A. Effects of conditioning on HMF content in unifloral honeys. *Food Chem.* **85**, 305–313 (2004).
145. Visquert Fas, M. Influencia de las condiciones térmicas en la calidad de la miel. (Universidad Politécnica de Valencia, 2015).
146. Pastoriza de la Cueva, S. Efecto de la ingesta de compuestos avanzados de la reacción de Maillard sobre el metabolismo gastrointestinal. (Universidad de Granada, 2013).
147. Martins, S. I. F. ., Jongen, W. M. . & van Boekel, M. A. J. . A review of Maillard reaction in food and implications to kinetic modelling. *Trends Food Sci. Technol.* **11**, 364–373 (2000).
148. Melucci, D. *et al.* Checking syrup adulteration of honey using bioluminescent bacteria and chemometrics. *Eur. Food Res. Technol.* **245**, 315–324 (2019).
149. Troncoso, A., García Parrilla, M. C., Torija, M. J. & Mas, A. El vinagre de vino. *ACE: Revista de enología* **140**, 1–6 (2013).
150. Torrecilla, J. S., Aroca-Santos, R., Cancilla, J. C. & Matute, G. Algorithmic modeling of spectroscopic data to quantify binary mixtures of vinegars of different botanical origins. *Anal. Methods* **8**, 2786–2793 (2016).
151. Ríos-Reina, R. *et al.* Excitation-emission fluorescence as a tool to assess the presence of grape-must caramel in PDO wine vinegars. *Food Chem.* **287**, 115–125 (2019).
152. Budak, N. H. *et al.* Effects of apple cider vinegars produced with different techniques on blood lipids in high-cholesterol-fed rats. *J. Agric. Food Chem.* **59**, 6638–44 (2011).
153. Ho, C. W., Lazim, A. M., Fazry, S., Zaki, U. K. H. H. & Lim, S. J. Varieties, production, composition and health benefits of vinegars: A review. *Food Chem.* **221**, 1621–1630 (2017).
154. Mercasa. *Alimentación en España 2018*. (MIC, 2019).
155. KAŁUŻNY, J. *et al.* An innovative system for piston engine combustion with laser-

- induced ignition of the hydrocarbon fuel consisting carbon nanotubes. *Combust. Engines* **168**, 3–14 (2017).
156. Fortes, F. J., Moros, J., Lucena, P., Cabalin, L. M. & Laserna, J. J. Laser-Induced Breakdown Spectroscopy. *Anal. Chem.* **85**, 640–669 (2013).
  157. Multari, R. A., Foster, L. E., Cremers, D. A. & Ferris, M. J. Effect of Sampling Geometry on Elemental Emissions in Laser-Induced Breakdown Spectroscopy. *Appl. Spectrosc.* **50**, 1483–1499 (1996).
  158. Lucena, P., Doña, A., Tobaría, L. M. & Laserna, J. J. New challenges and insights in the detection and spectral identification of organic explosives by laser induced breakdown spectroscopy. *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.* **66**, 12–20 (2011).
  159. St-Onge, L., Sing, R., Béchar, S. & Sabsabi, M. Carbon emissions following 1.064  $\mu\text{m}$  laser ablation of graphite and organic samples in ambient air. *Appl. Phys. A Mater. Sci. Process.* **69**, S913–S916 (1999).
  160. Trautner, S. *et al.* Laser-induced optical breakdown spectroscopy of polymer materials based on evaluation of molecular emission bands. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **174**, 331–338 (2017).
  161. González-Miret, M. L., Terrab, A., Hernanz, D., Fernández-Recamales, M. Á. & Heredia, F. J. Multivariate Correlation between Color and Mineral Composition of Honeys and by Their Botanical Origin. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 2574–2580 (2005).
  162. Solayman, M. *et al.* Physicochemical Properties, Minerals, Trace Elements, and Heavy Metals in Honey of Different Origins: A Comprehensive Review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **15**, 219–233 (2016).
  163. Paramas, A. *et al.* Geographical discrimination of honeys by using mineral composition and common chemical quality parameters. *J. Sci. Food Agric.* **80**, 157–165 (2000).
  164. Chudzinska, M. & Baralkiewicz, D. Estimation of honey authenticity by multielements characteristics using inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) combined with chemometrics. *Food Chem. Toxicol.* **48**, 284–290 (2010).
  165. de Alda-Garcilope, C., Gallego-Picó, A., Bravo-Yagüe, J. C., Garcinuño-Martínez, R. M. & Fernández-Hernando, P. Characterization of Spanish honeys with protected designation of origin “Miel de Granada” according to their mineral content. *Food Chem.* **135**, 1785–1788 (2012).
  166. Torrecilla, J. S., Fernández-Ruiz, V., Cámara, M. & Sánchez Mata, M. C. The ability of spectrum autocorrelation models to predict the lycopene concentration in foods through visible spectroscopic data. *Talanta* **85**, 2479–2483 (2011).
  167. Zechmeister, L., LeRosen, A. L., Schroeder, W. A., Polgár, A. & Pauling, L. Spectral Characteristics and Configuration of Some Stereoisomeric Carotenoids Including Prolycopene and Pro- $\gamma$ -carotene. *J. Am. Chem. Soc.* **65**, 1940–1951 (1943).
  168. Kantz, H. & Schreiber, T. *Nonlinear time series analysis*. (Cambridge University Press, 2004).
  169. *Guidance Document on the Validation of (Quantitative) Structure-Activity Relationship [(Q)SAR] Models*. (OECD, 2014). doi:10.1787/9789264085442-en
  170. Milena Roa Martínez, S. & Loaiza Correa, H. Evaluación de técnicas para el análisis de relevancia basadas en filtros sobre imágenes radiológicas. *Rev. Ing. Biomédica* **5**, 26–34 (2011).
  171. Siddiqui, A. J., Musharraf, S. G., Choudhary, M. I. & Rahman, A.-. Application of analytical methods in authentication and adulteration of honey. *Food Chem.* **217**,

- 687–698 (2017).
172. Ruoff, K. *et al.* Authentication of the Botanical and Geographical Origin of Honey by Front-Face Fluorescence Spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 6858–6866 (2006).
  173. Nikolova, K., Eftimov, T., Aladjadjiyan, A. & 2014, undefined. Fluorescence spectroscopy as method for quality control of honey. *Adv. Res.* **2**, 95–108 (2014).
  174. Sanhueza Rojas, O. H. Caracterización química multifactorial de miel en relación a la infección por *Nosema ceranae* en abejas, actividad antimicrobiana y origen geográfico del producto. (Universidad de Chile, 2016).
  175. Wang, H. *et al.* Excitation-Emission Fluorescence Characterization Study of the Three Phenolic Compounds. *Spectrosc. Spectr. Anal.* **30**, 1271–1274 (2010).
  176. Aitkenhead, C., Rosendale, D., Schlothauer, R. & Stephens, J. M. C. Method and apparatus that utilises fluorescence to determine plant or botanical origin characteristics of honey. *U.S. Patent and Trademark Office* 26 (2014).
  177. Karoui, R., Dufour, E., Bosset, J.-O. & De Baerdemaeker, J. The use of front face fluorescence spectroscopy to classify the botanical origin of honey samples produced in Switzerland. *Food Chem.* **101**, 314–323 (2007).
  178. Lenhardt, L., Bro, R., Zeković, I., Dramićanin, T. & Dramićanin, M. D. Fluorescence spectroscopy coupled with PARAFAC and PLS DA for characterization and classification of honey. *Food Chem.* **175**, 284–291 (2015).
  179. Yang, H. *et al.* Study on Fluorescence Spectra of Thiamine and Riboflavin. in *Atlantis Press* (ed. 3rd International Conference on Material, M. and M. E. (IC3ME 2015)) (2015).
  180. Karoui, R., Dufour, E., Bosset, J. O. & De Baerdemaeker, J. The use of front face fluorescence spectroscopy to classify the botanical origin of honey samples produced in Switzerland. *Food Chem.* **101**, 314–323 (2007).
  181. Bong, J., Loomes, K. M., Schlothauer, R. C. & Stephens, J. M. Fluorescence markers in some New Zealand honeys. *Food Chem.* **192**, 1006–1014 (2016).
  182. Sanhueza Rojas, O. H. Caracterización química multifactorial de miel en relación a la infección por *Nosema ceranae* en abejas, actividad antimicrobiana y origen geográfico del producto. (Universidad de Chile, 2016).
  183. Mishra, P., Lleó, L., Cuadrado, T., Ruiz-Altisent, M. & Hernández-Sánchez, N. Monitoring oxidation changes in commercial extra virgin olive oils with fluorescence spectroscopy-based prototype. *Eur. Food Res. Technol.* **244**, 565–575 (2018).
  184. Ferreiro-González, M. *et al.* Authentication of virgin olive oil by a novel curve resolution approach combined with visible spectroscopy. *Food Chem.* **220**, 331–336 (2017).
  185. Tarakowski, R., Malanowski, A., Kościeszka, R. & Siegoczyński, R. M. VIS spectroscopy and pressure induced phase transitions – Chasing the olive oils quality. *J. Food Eng.* **122**, 28–32 (2014).
  186. Torrecilla, J. S. *The olive : its processing and waste management*. (Nova Science Publishers, 2010).
  187. Demuth, H., Beale, M. & Hagan, M. Neural network toolbox: for use with MATLAB: user's guide: version 5. (2007).
  188. Rossi, P. *et al.* The use of artificial neural network modeling to represent the process of concentration by molecular distillation of omega-3 from squid oil. *Grasas y Aceites* **65**, e052 (2014).

189. Torrecilla, J. S., Aragón, J. M. & Palancar, M. C. Optimization of an Artificial Neural Network by Selecting the Training Function. Application to Olive Oil Mills Waste. *Ind. Eng. Chem. Res.* **47**, 7072–7080 (2008).
190. Lazzerini, C. & Domenici, V. Pigments in Extra-Virgin Olive Oils Produced in Tuscany (Italy) in Different Years. *Foods* **6**, 25 (2017).
191. Kubista, M., Sjöback, R., Eriksson, S. & Albinsson, B. Experimental correction for the inner-filter effect in fluorescence spectra. *Analyst* **119**, 417–419 (1994).
192. Chen, S., Yu, Y.-L. & Wang, J.-H. Inner filter effect-based fluorescent sensing systems: A review. *Anal. Chim. Acta* **999**, 13–26 (2018).
193. Alarcón, F., Báez, M. E., Bravo, M., Richter, P. & Fuentes, E. Screening of edible oils for polycyclic aromatic hydrocarbons using microwave-assisted liquid–liquid and solid phase extraction coupled to one- to three-way fluorescence spectroscopy analysis. *Talanta* **100**, 439–446 (2012).
194. Lastra-Mejías, M. *et al.* Chaotic parameters from fluorescence spectra to resolve fraudulent mixtures of fresh and expired protected designation of origin extra virgin olive oils. *Talanta* **195**, 1–7 (2019).
195. Torrecilla, J. S., Vidal, S., Aroca-Santos, R., Wang, S. C. & Cancilla, J. C. Spectroscopic determination of the photodegradation of monovarietal extra virgin olive oils and their binary mixtures through intelligent systems. *Talanta* **144**, 363–368 (2015).
196. Torrecilla, J. S., García, J., García, S. & Rodríguez, F. Application of lag-k autocorrelation coefficient and the TGA signals approach to detecting and quantifying adulterations of extra virgin olive oil with inferior edible oils. *Anal. Chim. Acta* **688**, 140–145 (2011).
197. Aroca-Santos, R., Cancilla, J. C., Matute, G. & Torrecilla, J. S. Identifying and Quantifying Adulterants in Extra Virgin Olive Oil of the Picual Varietal by Absorption Spectroscopy and Nonlinear Modeling. *J. Agric. Food Chem.* **63**, 5646–5652 (2015).



*[Faint, illegible handwritten text in a cursive script, likely from an old manuscript or letter.]*

**ANEXO: Publicaciones**

