



Universidad de Oviedo

**MÁSTER EN CIENCIAS ANALÍTICAS Y BIOANALÍTICAS**

**Trabajo Fin de Máster**

**DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE MONO Y  
DISACÁRIDOS EN ZUMOS DE FRUTAS MEDIANTE  
TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS**

**SERGIO ZAPICO SUÁREZ**

**Julio 2013, Oviedo**

**ROSANA BADÍA LAÍÑO**, Profesora titular de universidad adscrita al Departamento de Química Física y Analítica de la Facultad de Química de la Universidad de Oviedo,

**DECLARA:**

Que el presente trabajo titulado “*Determinación simultánea de mono y disacáridos en zumos de frutas mediante técnicas espectroscópicas*” ha sido realizado por el Licenciado **Sergio Zapico Suárez** en los Servicios Científico-Técnicos de la Universidad de Oviedo bajo su tutoría, constituyendo el Trabajo de Fin de Máster del interesado, cuya presentación autorizo.

Oviedo, Julio 2013



# ÍNDICE

|   | Página |
|---|--------|
| 1. Objetivos  | 4      |
| 2. Introducción   | 5      |
| 2.1. Zumos de naranja   | 5      |
| 2.2. FTIR   | 12     |
| 2.3. ATR  | 15     |
| 2.4. Análisis multivariante                                     | 17     |
| 3. Materiales, equipos y reactivos                              | 20     |
| 4. Procedimientos   | 21     |
| 4.1. Preparación de muestras puras                              | 21     |
| 4.2. Obtención de los espectros ATR-FTIR muestras evaporadas    | 24     |
| 4.3. Obtención de los espectros ATR-FTIR para muestras líquidas | 24     |
| 4.4. Limpieza del ATR entre medidas                             | 24     |
| 4.5. Condiciones de medida de los espectros FTIR                | 24     |
| 5. Resultados y discusión                                       | 27     |
| 5.1. Análisis univariante                                       | 27     |
| 5.1.1. Glucosa  | 27     |
| 5.1.2. Fructosa   | 30     |
| 5.1.3. Sacarosa   | 33     |
| 5.1.4. Comparación con valores teóricos                         | 35     |
| 5.2. Análisis multivariante                                     | 37     |
| 5.2.1. Glucosa-Fructosa   | 37     |
| 5.2.2. Glucosa-Sacarosa   | 38     |
| 5.2.3. Fructosa-Sacarosa  | 39     |
| 5.2.4. Primera aproximación: valores máximos                    | 40     |
| 5.2.5. Segunda aproximación: valores teóricos                   | 42     |
| 5.2.6. Comparación con valores teóricos                         | 46     |
| 6. Conclusiones   | 47     |
| 7. Bibliografía   | 48     |

## 1. OBJETIVOS

- Analizar la cantidad de dos monosacáridos (glucosa y fructosa) y de un disacárido (sacarosa) en zumos de frutas, empleando espectroscopía de infrarrojos y reflectancia total atenuada (ATR – FTIR).
- Evaluar la validez de la calibración univariante para dicha determinación y compararla con la de un método multivariante (mínimos cuadrados parciales, PLS).

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1. Zumos (de naranja)

Se define zumo como aquel líquido sin fermentar, pero fermentable, que se obtiene de las partes comestibles de las frutas en buen estado, debidamente maduras o frescas que se han mantenido en buen estado por procedimientos adecuados que nos permitan mantener las características físicas, químicas, organolépticas y nutricionales esenciales<sup>1</sup>.

Se pueden distinguir distintos tipos según los ingredientes empleados<sup>2</sup>:

- **Zumos naturales:** estabilizados por tratamientos físicos autorizados que garantizan su conservación.
- **Zumos conservados:** similares a los naturales pero a los que se les incorpora algún aditivo conservante autorizado.
- **Zumos azucarados:** contienen edulcorante, siendo el más común la sacarosa o azúcar común.
- **Zumos gasificados:** si llevan incorporado gas carbónico.

Según el proceso de fabricación<sup>2</sup>:

- **Zumo simple de fruta:** que contiene los mismos nutrientes (vitaminas y sales minerales) que la fruta de la que proceden excepto una cantidad apreciable de fibra que queda retenida por la pulpa. Se conserva por pasteurización o esterilización o UHT (tratamiento con calor para eliminar los posibles gérmenes adquiridos antes o durante el proceso de elaboración).

---

<sup>1</sup> Comisión del Codex Alimentarius (CODEX STAN 247-2005), [www.codexalimentarius.org](http://www.codexalimentarius.org), Última fecha de acceso: 03/07/2013

<sup>2</sup> A. Úbeda Gallego, "Análisis del perfil de azúcares en la autenticación de zumos de frutas", PFC/TFG-Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agrónoma 2013, páginas 4-5. Univ. Politécnica de Cartagena

- **Zumos concentrados:** han sufrido un proceso de concentración. Son el primer pilar del comercio internacional de zumos. Estos zumos constituyen una categoría diferente que se prepara por dilución con agua.
- **Zumos deshidratados:** elaborados a partir de zumos concentrados que se deshidratan por liofilización. El contenido en agua es inferior al 10%.
- **Zumo fresco:** producto que no ha sido congelado ni procesado ni pasteurizado. Suele elaborarse a pequeña escala.

A veces se confunde el término zumo con **néctar**, habiendo una diferencia nutritiva notable entre ambos. El néctar se obtiene a partir de frutas trituradas a las que se les ha añadido agua, azúcar y ácidos de fruta, por lo que aportan más calorías.

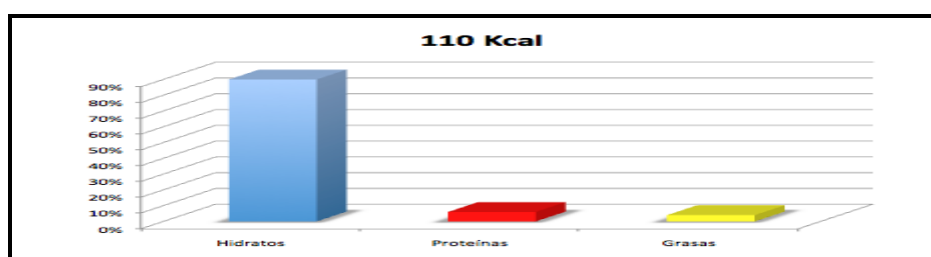
Dentro de la gran diversidad de zumos que existen, para nuestro trabajo nos vamos a centrar sobre todo en los **zumos de naranja** tanto concentrados como naturales.



La naranja es una de las frutas más populares que se obtiene de los naranjos, muy rica en vitaminas, sales minerales y azúcares. Destaca entre las preferencias de la población por su calidad, sus efectos beneficiosos sobre la salud y su razonable precio.

En forma de zumo, son numerosos los efectos beneficiosos que podemos destacar<sup>3</sup>:

1. Acción antioxidante
2. Prevención de piedras en el riñón gracias al contenido en citratos,
3. Reducción del riesgo de infartos
4. Disminución de la presión arterial y prevención de problemas cardiovasculares
5. Reducción de los niveles de colesterol “malo” (LDL).
6. Capacidad para proporcionar gran cantidad de agua para mantener una hidratación correcta, lo que mantiene el metabolismo activo y la piel sana.
7. Ayuda al cuerpo a procesar mejor los carbohidratos
8. Interviene en el equilibrio ácido-base
9. Contiene folato que desempeña un papel importante en la reproducción de nuevas células, ayuda a procesos de curación.

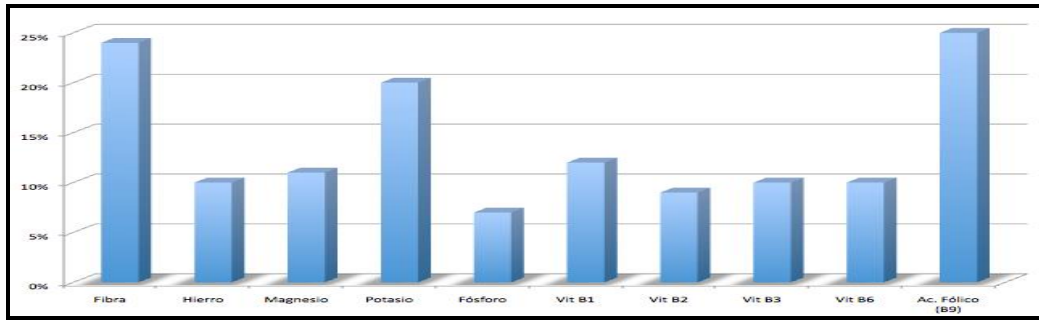


Grafica 1. Aporte energético de un vaso de zumo de naranja<sup>4</sup>

---

<sup>3</sup> Angel Gil-Izquierdo, María I. Gil and Federico Ferreres, Effect of processing Techniques at Industrial Scale on Orange Juice Antioxidant and Beneficial Health Compound, *J. Agric. Food Chem.*, 50 (18), 2002, pp 5107-5114

<sup>4</sup> Pilar Ruiz Perez-Cacho and Rusell Rouseff, Processing and Storage Effects on Orange Juice Aroma: A review, *J. Agric. Food Chem.*, 56 (21), 2008, pp 9785–9796



Gráfica 2. Porcentaje de micronutrientes aportados por un vaso de zumo de naranja<sup>4</sup>

Los principales parámetros que se analizan en un zumo de naranja y que nos permite comprobar la calidad del mismo son<sup>4</sup>:

- **Sólidos solubles:** azúcares y ácidos cuyo contenido varía según la variedad, grado de madurez y técnica de cultivo de las naranjas. En el proceso de maduración aumenta el contenido en azúcares en detrimento del contenido de los ácidos. Se mide empleando un parámetro llamado “grados Brix”.
- **Azúcares:** suman alrededor del 75% de los ácidos solubles, estando equilibrados los azúcares reductores (glucosa y fructosa) y los no reductores (sacarosa). Durante el tratamiento y almacenamiento de los zumos se va hidrolizando la sacarosa transformándose en azúcares reductores.
- **Ácidos:** ácido cítrico en su mayoría. La acidez cambia según la variedad, zona de cultivo y maduración de las naranjas.
- **Vitamina C:** conocido como ácido ascórbico es el componente más importante de los frutos cítricos, estando presente sobre todo en la corteza, sólo la cuarta parte pasa al zumo.

<sup>3</sup>Angel Gil-Izquierdo, María I. Gil and Federico Ferreres, Effect of processing Techniques at Industrial Scale on Orange Juice Antioxidant and Beneficial Health Compound, J. Agric. Food Chem., 50 (18), 2002, pp 5107-5114



- Índice de formol: presencia de ciertos aminoácidos.
- Nitrógeno total: se define como la relación constante entre proteínas y nitrógeno, hace posible saber la cantidad de proteínas presentes en el mismo.
- Cenizas: son los elementos minerales presentes en todos los alimentos.
- Índice de madurez: es la relación entre los grados Brix y la acidez. Elevados valores para este parámetro, refleja que el fruto posee una excesiva maduración.

En nuestro trabajo nos vamos a centrar exclusivamente en la medida de los azúcares presentes en los zumos.

Los azúcares son sólidos a temperatura ambiente; son incoloros, cristalinos, dulces y solubles en agua. La glucosa y la fructosa son monosacáridos mientras que la sacarosa es un disacárido formado por una glucosa y una fructosa.

La **glucosa** es el hidrato de carbono más elemental y esencial para la vida. Su fórmula molecular es  $C_6H_{12}O_6$ . Es una aldohexosa ya que el grupo carbonilo está en el extremo de la molécula.

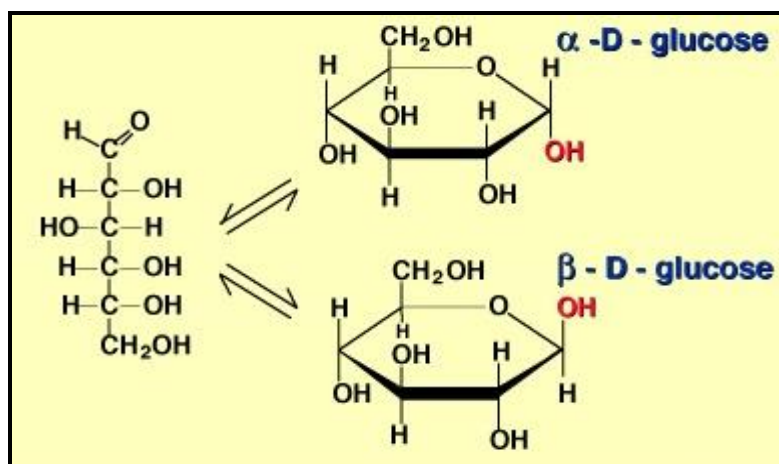


Figura 1. Fórmula de Fisher y Haworth de la D-Glucosa

En disolución acuosa, la glucosa forma un hemiacetal intramolecular adquiriendo configuración de un heterociclo llamado piranosa. Es un azúcar reductor y el carbohidrato más abundante en la naturaleza encontrándose en la sangre en una concentración de un gramo por litro. Al polimerizarse da lugar a polisacáridos con función energética o función estructural como la celulosa de las plantas. Es la principal fuente de energía celular y es también fuente de carbono en organismos heterótrofos.

La **fructosa** se obtiene de las frutas. Es un isómero de la glucosa y por tanto, tiene la misma fórmula empírica que la de ésta aunque con diferente estructura. Es una cetohexosa ya que el grupo carbonilo no se encuentra en el extremo de la molécula, sino en el C<sub>2</sub>.

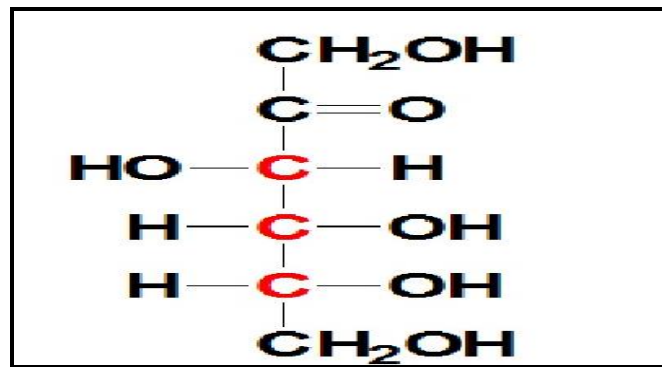


Figura 2. Fórmula de Fisher de la D-Fructosa

Esta molécula tiene tres carbonos asimétricos y se cicla formando un hemiacetal intramolecular entre el C<sub>2</sub> y el C<sub>5</sub> adquiriendo configuración de furanosa.

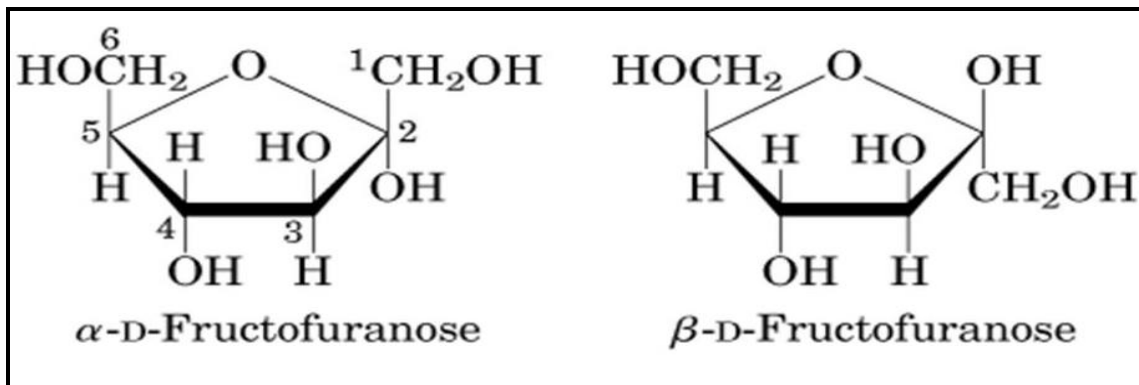


Figura 3. Fórmulas de proyección de Haworth de  $\alpha$ -D-Fructofuranosa y  $\beta$ -D-Fructofuranosa

La **sacarosa** es un disacárido compuesto de glucosa y fructosa, llamado azúcar de mesa, es un azúcar no reductor, puesto que los carbonos anoméricos de sus dos unidades monosacáridos constituyentes se hallan unidos entre sí, covalentemente mediante un enlace O-Glucosídico. Está formado por  $\alpha$ -glucopiranososa y  $\beta$ -fructofuranosa.

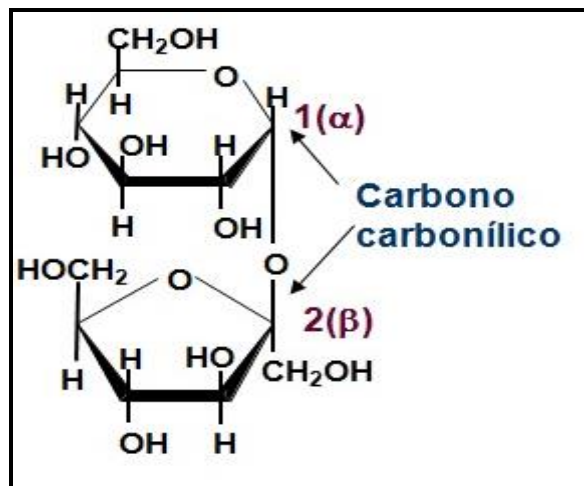


Figura 4. Fórmula Haworth de la sacarosa

Los porcentajes aproximados que le corresponde a cada uno de estos azúcares en los zumos con respecto a los otros componentes es:

| Componentes             | Porcentaje (%) |
|-------------------------|----------------|
| Agua                    | 87,4           |
| Glucosa y Fructosa      | 5,2            |
| Sacarosa                | 4,7            |
| Ácidos                  | 1              |
| Sustancias nitrogenadas | 1              |
| Lípidos                 | 0,33           |
| Cenizas                 | 0,37           |

Tabla 1. Parámetros analizados en un zumo de naranja y porcentajes teóricos<sup>5</sup>

<sup>5</sup> Inyang UE. Abah UJ., Chemical composition and organoleptic evaluation of juice from steamed cashew apple blended with orange juice, , Plants Foods for Human Nutrition, 50, 4, 1997, pp 295-300

## 2.2. FT-IR (Fourier Transform Infrared Spectrometry)

La espectrofotometría de infrarrojos por transformada de Fourier es una técnica de absorción de radiación infrarroja. El espectro obtenido durante una medida FT-IR representa la absorción de radiación infrarroja por parte de las moléculas que forman la muestra, creándose una huella molecular característica que está relacionada con los modos de vibración de los enlaces de la molécula. Cada molécula genera su propia huella característica lo que la convierte en una técnica idónea tanto para el análisis cualitativo como el cuantitativo.

El desarrollo de FT-IR vino dado para corregir las limitaciones que tenían los métodos usados hasta ese momento, sobretodo métodos dispersivos cuyo principal inconveniente era la lentitud del proceso. Para solucionar esto se desarrolló un dispositivo óptico conocido como interferómetro.



Figura 5. Señal producida por un interferómetro

El interferómetro produce un único tipo de señal codificada que contiene todas las frecuencias del infrarrojo. La señal se mide de forma muy rápida en el orden de un segundo. El interferómetro más común en espectroscopía FTIR es el conocido como interferómetro de Michelson, que emplea un divisor de haz (*beam splitter* en inglés) que divide el haz incidente en dos, haciendo que uno de ellos se refleje en un cristal plano que está fijado en un punto determinado (espejo fijo) y el otro se refleje en otro cristal plano pero que a diferencia del anterior tiene un mecanismo que permite su

movimiento (espejo móvil). A continuación, el haz vuelve a recombinarse al volver al divisor y ser dirigido hacia la muestra, tras atravesarla llega al detector, donde se obtiene un patrón de interferencia conocido como *interferograma*.

El interferograma lleva codificada en su interior información sobre la absorción a cada longitud de onda, aunque ésta no puede extraerse de forma trivial. Se requiere emplear una compleja operación matemática conocida como *Transformada de Fourier* (FT).

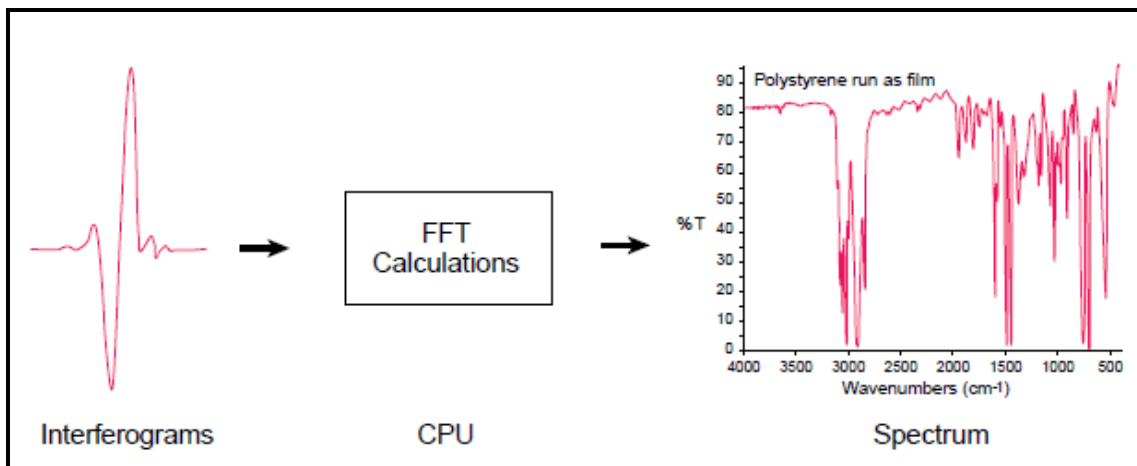


Figura 6. Secuencia seguida para la decodificación de la señal obtenida en el interferograma

En el proceso de obtención de la señal participan<sup>6</sup>:

- 1) Fuente: existen muchos tipos de fuentes de radiación infrarroja. El rayo pasa por una apertura que permite controlar la cantidad de energía que llega a la muestra y al detector.
- 2) Interferómetro: el rayo entra al interferómetro donde se origina un patrón de interferencia que se hace incidir sobre la muestra.

<sup>6</sup> Thermo Nicolet Corporation, *Introduction to Fourier Transform Infrared Spectrometry*, 2001,

- 3) Muestra: En espectrometría infrarroja de absorción, el haz atraviesa la muestra, de forma que se absorben las frecuencias específicas características de la muestra.
- 4) Detector: el rayo incide en el detector, donde se convierte la intensidad de la radiación infrarroja en una señal eléctrica.
- 5) Ordenador: La señal producida en el detector es analizada y transformada por el ordenador hasta obtener el espectro IR final.

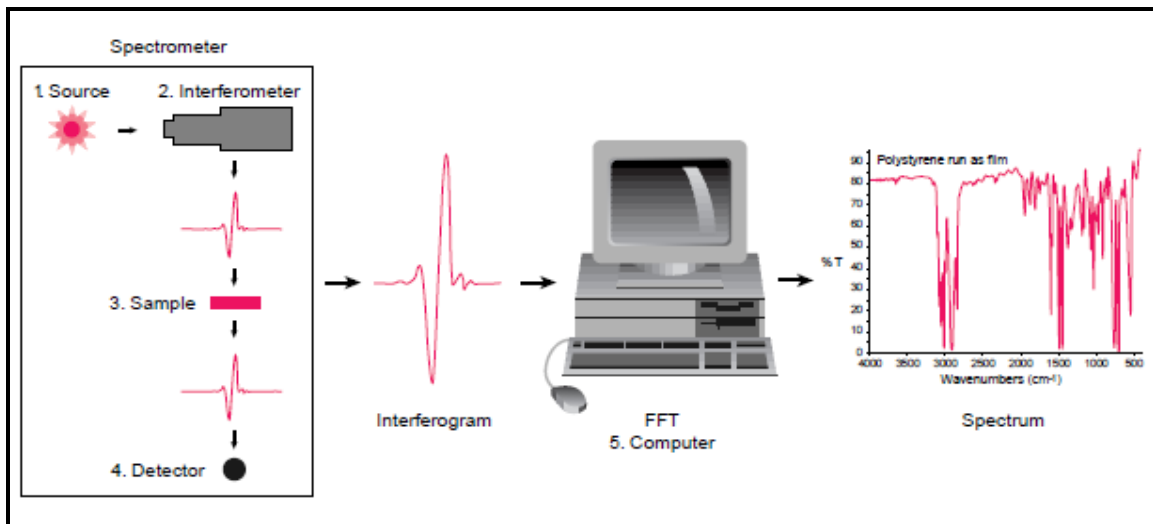


Figura 7. Proceso seguido para la obtención de la señal

El empleo de esta técnica nos permite:

- Identificación de muestra (análisis cualitativo)
- Llevar a cabo controles de calidad y rutinarios de la muestra
- Cuantificación de muestras (Análisis cuantitativos)

Además algunas de sus ventajas respecto a otros métodos de IR son:

- No es una técnica destructiva, aunque en ocasiones es necesario diluir la muestra con KBr

- No requiere calibración externa del equipo para dar una medida precisa
- Aumento de la velocidad de los análisis, obteniéndose medidas cada segundo
- Aumento de la sensibilidad y mayores rendimientos ópticos
- Mecánica muy simple

### 2.3. Reflectancia Total Atenuada (ATR)

Se basa en el fenómeno de reflexión total interna. Este fenómeno se produce cuando un haz de luz intenta pasar de un medio de índice de refracción mayor a otro de índice de refracción menor con un ángulo menor que el conocido como ángulo crítico. En esas condiciones, el haz no puede cambiar de medio, de tal forma que se refleja completamente. Sin embargo, en el punto en el que se produce la reflexión total surge una onda estacionaria conocida como *onda evanescente* que penetra unas pocas micras (la penetración depende de la longitud de onda del haz incidente así como de otros factores como son el índice de refracción del material de mayor índice de refracción, de la muestra y del ángulo de entrada del haz de luz) en el medio de índice de refracción menor. De esta forma, si ese medio de índice de refracción menor es una muestra desconocida, absorberá parte de la radiación de la onda evanescente y el haz reflejado llevará, por tanto, información sobre la absorción de la muestra<sup>7</sup>.

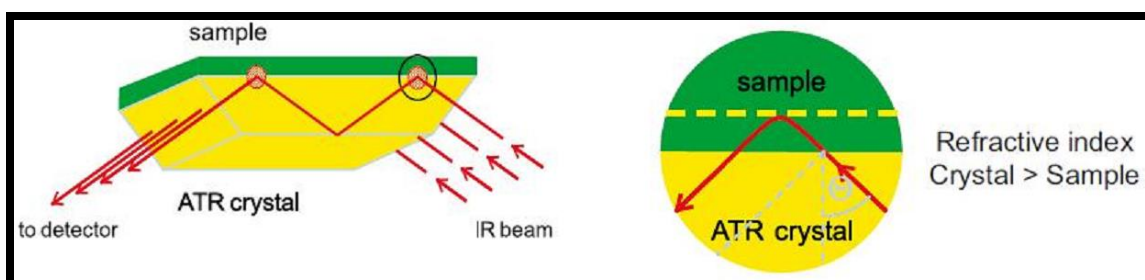


Figura 8. Principio y efecto que se produce en la interfase entre la muestra y el cristal en ATR

Los dispositivos de medida mediante reflexión total atenuada, conocidos por sus siglas en inglés ATR (*Attenuated Total Reflectance*) pueden ser de reflexión simple (si sólo se

<sup>7</sup> D.A. Skoog & J.J. Leary, *Análisis Instrumental*, McGraw-Hill, 4ª Ed, Cap. 12

produce una única reflexión en la muestra) o de reflexión múltiple (si se producen varias). Normalmente, los ATR de los dispositivos de infrarrojos consisten en un cristal de un material de alto índice de refracción para el infrarrojo (e.g. Ge o diamante).

Para conseguir una buena calidad en la obtención del espectro se deben cumplir algunos requerimientos<sup>8</sup>:

- 1) Buen contacto entre la muestra y el cristal ATR para asegurarnos que la onda evanescente penetra en la muestra.
- 2) El índice de refracción del cristal debe ser significativamente mayor que el de la muestra.

Las ventajas que tiene el empleo de esta técnica es<sup>7</sup>:

- Muestreo más rápido sin apenas preparación
- Excelente reproducibilidad entre muestras
- Mínimas variaciones inducidas por cambios en el operador

---

<sup>7</sup>D.A. Skoog & J.J. Leary , Análisis Instrumental, McGraw-Hill, 4ª Ed, Cap. 12,



## 2.4. Análisis Multivariante

Tradicionalmente, la forma habitual de determinar la concentración de un determinado analito a partir de una serie de datos es el análisis univariante. Este tipo de análisis correlaciona la concentración de una serie de patrones con un único valor de la serie de datos obteniendo una recta de calibrado, posteriormente empleada para determinar la concentración de la muestra desconocida. Esta forma de trabajar es intuitiva y simple, aunque a su vez es limitada y poco útil. A modo de ejemplo, considerando un espectro UV-Vis de un analito del que se ha medido la absorción a 500 longitudes de onda diferentes, emplear un único dato (una sola longitud de onda) para determinar la concentración implica desprestigiar el 99,8% de los datos obtenidos. Trabajar de esta forma limita el rendimiento del método, pudiendo tomar datos que no sean representativos de la medida que nos interesa. Además en los métodos univariantes, las medidas son extremadamente sensibles a interferentes, siendo difícil distinguir entre la señal de un analito específico y la de un interferente<sup>9</sup>.

Alternativamente, los métodos multivariantes emplean múltiples variables. Este hecho nos va a ofrecer muchas ventajas en lo que se refiere a reducción del ruido y eliminación de interferentes, siendo más fácil identificar y eliminar el ruido cuanto tenemos en cuenta el conjunto total de los datos.

Por lo general los métodos multivariantes son mejores que los univariantes, ya que aumenta la cantidad de información que podemos obtener<sup>8</sup>.

La construcción de modelos de calibración multivariante debe permitir predecir el valor de la variable que nos interese medir, en nuestro caso concentraciones. Para que

---

<sup>8</sup> Richar B. Keithley, Michael L. Heien, R. Mark Wightman. Multivariate Concentration determination using principal component regression with residual analysis, *Trend in Analytical Chemistry*, 28, 9, 2009, pp 1127-1136

estas predicciones sean fiables los modelos obtenidos deben ser robustos y deben construirse siguiendo una serie de pasos<sup>9</sup>:

- 1) Definición de un conjunto de calibración o conjunto de entrenamiento (training set): A partir de él conoceremos la propiedad a determinar y debe ser representativo de todo el intervalo de los datos así como de las posibles interferencias y otros componentes presentes en las muestras, aunque no vayan a ser determinados.
- 2) Registro de la información analítica
- 3) Pretratamiento de los datos: se minimizan las contribuciones no deseadas presentes en la señal analítica que disminuyen la reproducibilidad y pueden provocar que el sistema tenga comportamientos que den lugar a resultados erróneos de los parámetros deseados.
- 4) Selección del modelo: establece la relación más simple entre la señal analítica y la propiedad a determinar. En muchas ocasiones implica un estudio complejo de la matriz de datos analíticos obtenidos, ya que no siempre es necesaria la utilización de toda la información registrada.
- 5) Validación del modelo: implica su aplicación a un número de muestras de las que se conoce la propiedad a determinar y que no han sido utilizadas en la etapa de construcción del modelo. Verificamos de esta forma que el modelo constituye una correcta descripción del sistema de estudio.
- 6) Predicción de nuevas muestras: con el modelo construido y validado, se calcula la propiedad estudiada en nuevas muestras, a las que previamente se ha registrado la señal analítica.

---

<sup>9</sup> Guillermo Ramis Ramos, M<sup>a</sup> Celia García Álvarez-Coque, *Quimiometría*, Editorial Síntesis, 2001.

En nuestro caso particular vamos a trabajar con un método de calibración multivariante conocido como cuadrados mínimos parciales o PLS, por sus siglas en inglés (*Partial Least-Squares*).

### **3. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS**

#### **Materiales**

- Matraz aforado de 10 mL
- Vaso de precipitados de 10 mL
- Pesasustancias
- Espátula
- Pipeta
- Mortero de ágata con mano

#### **Equipos**

- Balanza analítica Mettler Toledo con precisión de décima de miligramo
- Espectrofotómetro de infrarrojo FT-IR Varian 620-IR acoplado con un dispositivo de medida por reflectancia total atenuada (ATR) modelo Golden Gate

#### **Reactivos**

Los reactivos utilizados son:

- D(-)-Glucosa anhidra GPR-Rectapur
- D(-)-Fructosa GPR-Rectapur
- D(+)-Sacarosa GPR-Rectapur

Todas las disoluciones empleadas en este trabajo se prepararon empleando agua destilada.

#### **Software**

- MatLab, The MathWorks inc., versión 6.1.0.450

## 4. PROCEDIMIENTOS

### 4.1. Preparación de muestras puras

Se siguieron procedimientos análogos para la preparación de las disoluciones puras de los tres azúcares de interés. Para la glucosa y la fructosa se emplearon además las mismas cantidades por tener el mismo peso molecular.

El protocolo de preparación fue el siguiente:

- 1) Se pesa la cantidad de mono- / disacárido correspondiente con la mayor precisión posible y anotando en cualquier caso el peso exacto.
- 2) Se transfiere la cantidad pesada a un vaso de precipitados y se la disuelve en un volumen aproximado de 5 mL.
- 3) Se transvasa el azúcar ya disuelto a un matraz aforado de 10 mL, se enrasa hasta el aforo y se homogeniza.
- 4) Una vez preparadas las disoluciones, se transfieren a recipientes de vidrio cerrados para su transporte y eventual mantenimiento.

Las cantidades de azúcar se obtienen de la fórmula:

$$10 \text{ mL de disolución} * 1\text{L}/1000\text{mL} * X_1 \text{ mol}/1\text{L} * 180,16 \text{ g}/1\text{mol} = X_2 \text{ gramos}$$

Donde  $X_1$  es la concentración que nos interesa obtener del azúcar y  $X_2$  la cantidad en que debemos pesar.

| [Glucosa] (M) | Cantidad teórica (g) | Cantidad medida (g) | [Glucosa real] (M) |
|---------------|----------------------|---------------------|--------------------|
| 1,000         | 1,801                | 1,803               | 1,001              |
| 0,800         | 1,441                | 1,444               | 0,802              |
| 0,650         | 1,171                | 1,172               | 0,651              |
| 0,500         | 0,900                | 0,901               | 0,501              |
| 0,400         | 0,720                | 0,719               | 0,399              |

Tabla 2. Concentraciones y cantidades exactas de glucosa

| [Fructosa] (M) | Cantidad teórica (g) | Cantidad medida (g) | [Fructosa real] (M) |
|----------------|----------------------|---------------------|---------------------|
| 1,000          | 1,801                | 1,806               | 1,002               |
| 0,800          | 1,441                | 1,437               | 0,797               |
| 0,650          | 1,171                | 1,176               | 0,652               |
| 0,500          | 0,900                | 0,909               | 0,505               |
| 0,400          | 0,720                | 0,722               | 0,401               |

Tabla 3. Concentraciones y cantidades exactas de fructosa

Para la preparación de la sacarosa, se emplean los mismos factores de conversión con el único cambio de la masa molar, que pasa de 180,16 g/mol (glucosa-fructosa) a 360,32 g/mol.

$$10 \text{ mL de disolución} * 1\text{L}/1000\text{mL} * X_1 \text{ mol}/1\text{L} * 360,32 \text{ g}/1\text{mol} = X_2 \text{ gramos}$$

| [Sacarosa] (M) | Cantidad teórica (g) | Cantidad medida (g) | [Sacarosa real] (M) |
|----------------|----------------------|---------------------|---------------------|
| 1,000          | 3,422                | 3,433               | 1,003               |
| 0,800          | 2,738                | 2,745               | 0,802               |
| 0,600          | 2,053                | 2,049               | 0,599               |
| 0,400          | 1,368                | 1,362               | 0,398               |
| 0,200          | 0,684                | 0,691               | 0,202               |

Tabla 4. Concentraciones y cantidades exactas de la sacarosa

Para la preparación de las mezclas binarias (glucosa-fructosa; glucosa-sacarosa; fructosa-sacarosa) se siguió un procedimiento similar al descrito anteriormente, si bien pesando ambos azúcares en el mismo pesasustancias antes de disolverlos

| Disolución | Glucosa           |                     |                     |                        | Fructosa          |                     |                     |                        |
|------------|-------------------|---------------------|---------------------|------------------------|-------------------|---------------------|---------------------|------------------------|
|            | Concentración (M) | Cantidad exacta (g) | Cantidad medida (g) | Concentración real (M) | Concentración (M) | Cantidad exacta (g) | Cantidad medida (g) | Concentración real (M) |
| M1         | 0,100             | 0,180               | 0,181               | 0,101                  | 0,800             | 1,441               | 1,440               | 0,799                  |
| M2         | 0,200             | 0,360               | 0,364               | 0,202                  | 0,700             | 1,261               | 1,254               | 0,696                  |
| M3         | 0,400             | 0,720               | 0,726               | 0,403                  | 0,600             | 1,080               | 1,090               | 0,605                  |
| M4         | 0,400             | 0,720               | 0,726               | 0,403                  | 0,500             | 0,900               | 0,906               | 0,503                  |
| M5         | 0,600             | 0,900               | 0,904               | 0,602                  | 0,400             | 0,720               | 0,726               | 0,403                  |
| M6         | 0,700             | 1,261               | 1,267               | 0,703                  | 0,200             | 0,360               | 0,371               | 0,206                  |
| M7         | 0,800             | 1,441               | 1,441               | 0,800                  | 0,100             | 0,180               | 0,184               | 0,102                  |

Tabla 5. Concentraciones y cantidades empleadas para la mezcla glucosa-fructosa

| Disolución | Glucosa           |                     |                     |                        | Sacarosa          |                     |                     |                        |
|------------|-------------------|---------------------|---------------------|------------------------|-------------------|---------------------|---------------------|------------------------|
|            | Concentración (M) | Cantidad exacta (g) | Cantidad medida (g) | Concentración real (M) | Concentración (M) | Cantidad exacta (g) | Cantidad medida (g) | Concentración real (M) |
| M8         | 0,100             | 0,180               | 0,181               | 0,101                  | 0,700             | 2,394               | 2,394               | 0,700                  |
| M9         | 0,200             | 0,360               | 0,364               | 0,202                  | 0,600             | 2,052               | 2,056               | 0,601                  |
| M10        | 0,300             | 0,540               | 0,545               | 0,303                  | 0,500             | 1,710               | 1,710               | 0,500                  |
| M11        | 0,500             | 0,900               | 0,903               | 0,502                  | 0,400             | 1,368               | 1,366               | 0,399                  |
| M12        | 0,500             | 0,900               | 0,906               | 0,503                  | 0,300             | 1,026               | 1,026               | 0,300                  |
| M13        | 0,600             | 1,080               | 1,076               | 0,597                  | 0,200             | 0,684               | 0,684               | 0,200                  |
| M14        | 0,700             | 1,261               | 1,258               | 0,698                  | 0,100             | 0,342               | 0,342               | 0,100                  |

Tabla 6. Concentraciones y cantidades exactas empleadas para la mezcla glucosa-sacarosa

| Disolución | Fructosa          |                     |                     |                        | Sacarosa          |                     |                     |                        |
|------------|-------------------|---------------------|---------------------|------------------------|-------------------|---------------------|---------------------|------------------------|
|            | Concentración (M) | Cantidad exacta (g) | Cantidad medida (g) | Concentración real (M) | Concentración (M) | Cantidad exacta (g) | Cantidad medida (g) | Concentración real (M) |
| M15        | 0,100             | 0,180               | 0,182               | 0,101                  | 0,700             | 2,394               | 2,393               | 0,699                  |
| M16        | 0,200             | 0,360               | 0,358               | 0,198                  | 0,600             | 2,052               | 2,052               | 0,600                  |
| M17        | 0,300             | 0,540               | 0,541               | 0,301                  | 0,500             | 1,710               | 1,710               | 0,500                  |
| M18        | 0,300             | 0,540               | 0,538               | 0,298                  | 0,400             | 1,368               | 1,370               | 0,401                  |
| M19        | 0,500             | 0,900               | 0,905               | 0,502                  | 0,300             | 1,026               | 1,027               | 0,300                  |
| M20        | 0,600             | 1,080               | 1,081               | 0,601                  | 0,200             | 0,684               | 0,686               | 0,201                  |
| M21        | 0,700             | 1,261               | 1,261               | 0,700                  | 0,100             | 0,342               | 0,342               | 0,100                  |

Tabla 7. Concentraciones y cantidades exactas empleadas para la muestra fructosa-sacarosa

## 4.2. Obtención de los espectros ATR-FTIR para muestras evaporadas

Una gota con un volumen de 1,5  $\mu\text{L}$  se deposita delicadamente sobre el cristal de diamante del dispositivo ATR empleado para medir. Dicha gota debe quedar perfectamente centrada sobre el cristal, sin derramarse por los bordes, ya que eso implicaría la pérdida de parte de la muestra. A continuación se evapora mediante una suave corriente de nitrógeno hasta que puede observarse en el ordenador la desaparición de los picos de infrarrojo correspondientes al agua y la estabilización del resto del espectro.

## 4.3. Obtención de los espectros ATR-FTIR para muestras líquidas

En el caso de muestras líquidas, se deposita una gota de líquido sobre el cristal de diamante del dispositivo ATR empleado para medir tomando el espectro a continuación.

## 4.4. Limpieza del ATR entre medidas

Antes de cada medida, el cristal del ATR se limpia empleando un trozo de papel de laboratorio empapado en agua destilada. Durante este proceso se monitoriza en continuo el espectro FTIR, pudiendo así comprobar que tras el lavado desaparecen las bandas de la muestra anterior y el dispositivo queda limpio. En caso contrario se repite el protocolo de limpieza hasta que desaparezcan dichas bandas.

## 4.5. Condiciones de medida de los espectros FTIR

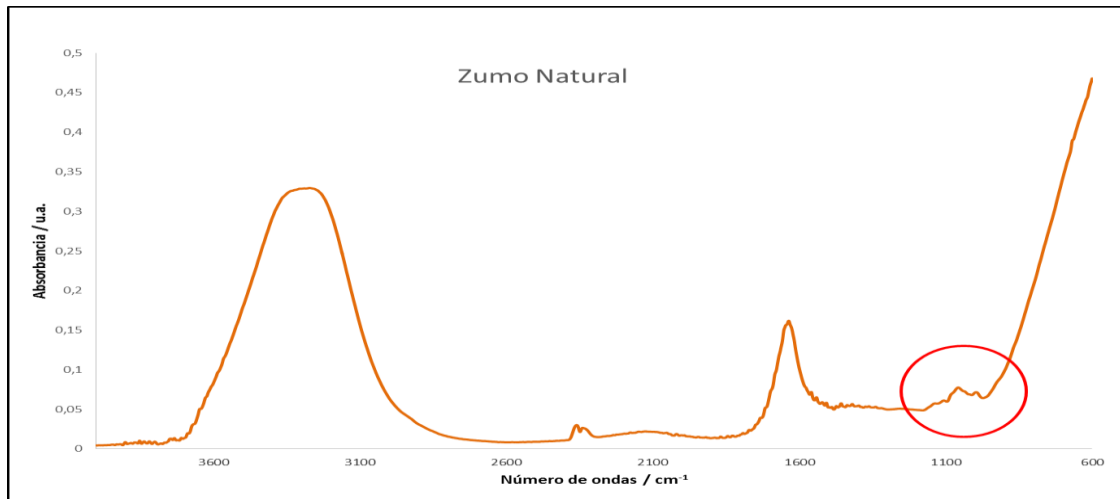
| Ajustes            |                             | Obtención de datos                       |          | Configuración del espectrómetro |                    |
|--------------------|-----------------------------|--|----------|---------------------------------|--------------------|
| Número de barridos | 16                          | Velocidad                                | 5 KHz    | Fuente IR                       | Fuente IR          |
| Resolución         | 4                           | Intervalo de muestreo del interferograma | 2        | Divisor de haz                  | KBr                |
| Rango de barrido   | 4000 a 600 $\text{cm}^{-1}$ | Filtro electrónico de paso bajo          | 1,28 KHz | Detector                        | D1a TGS, TE Cooled |
|                    |                             | Sensibilidad                             | 1        | Fuente                          | Abierta            |
|                    |                             | Retardo                                  | 0        | Atenuador                       | 100%               |

Tabla 8. Condiciones de medida de los espectros FTIR

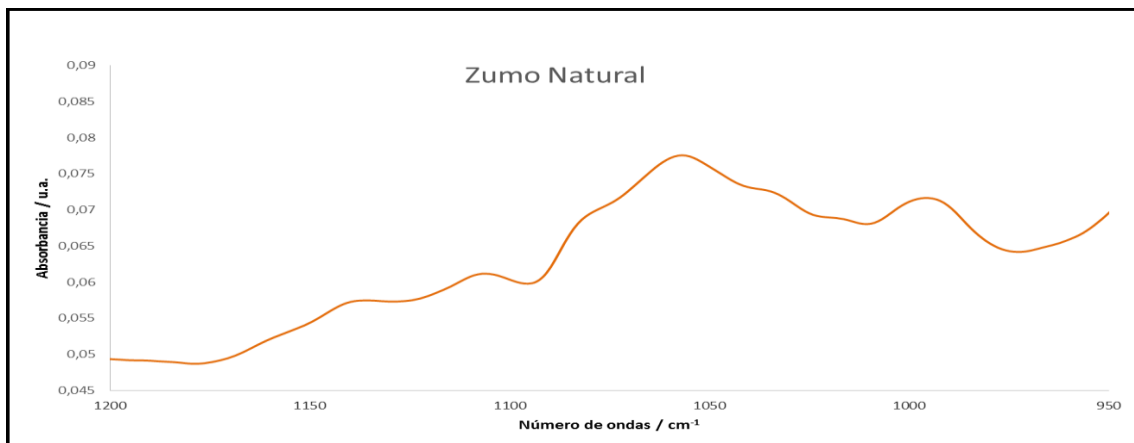


Previamente a comenzar los análisis de las muestras, se realiza una medida del fondo correspondiente, consistente con una medida con el ATR al aire.

Todos los espectros se miden en absorbancia por ser ésta proporcional a la concentración.



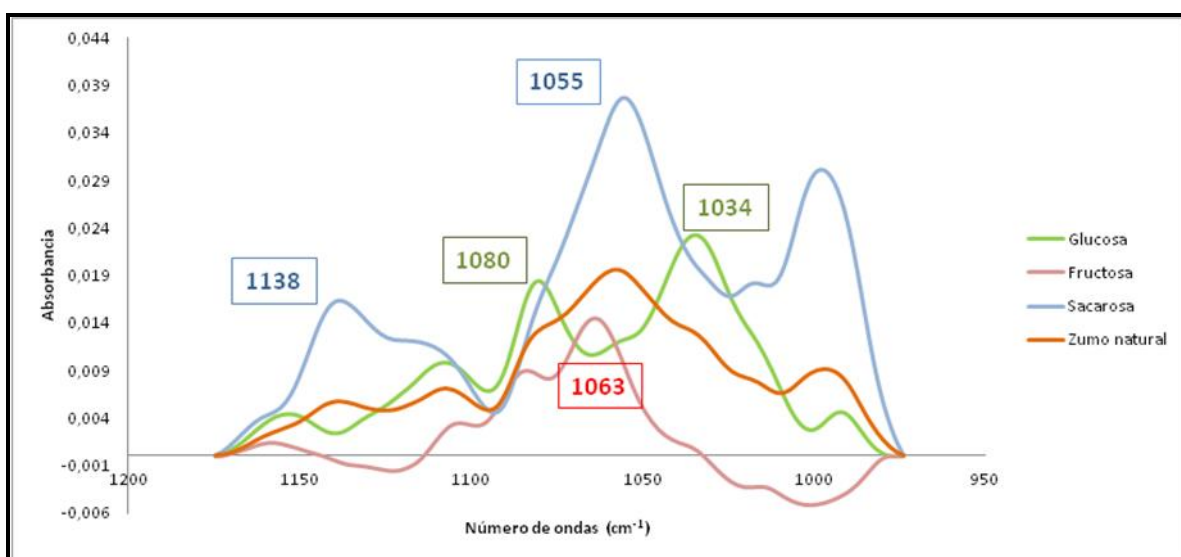
Gráfica 3. Ejemplo de un espectro obtenido para la medida de un zumo natural. En rojo la zona de interés para el estudio de los azúcares



Gráfica 4. Zona de interés ampliada

Los picos característicos que nos van a permitir distinguir la mayor o menor presencia de glucosa, fructosa y sacarosa serán los que están comprendidos entre los números de ondas que van de 950 a 1400  $\text{cm}^{-1}$ . . Las bandas entre 900 y 1153  $\text{cm}^{-1}$  se asignan a los enlaces C-O y C-C, mientras que las comprendidas entre 1199-1400  $\text{cm}^{-1}$  son debidas a los enlaces O-C-H, C-C-H y C-O-H. De forma que para la glucosa nos fijaremos en los números de ondas 1034 y 1080  $\text{cm}^{-1}$ ; para la fructosa 1063  $\text{cm}^{-1}$ ; y para la sacarosa 1055 y 1138  $\text{cm}^{-1}$ .<sup>10,11</sup>

Si hacemos una superposición de las concentraciones 0,4 M de los distintos azúcares puros y lo comparamos con el zumo natural vemos:



Gráfica 5. Comparativa entre el zumo natural y los azúcares puros entre 1200 y 950  $\text{cm}^{-1}$

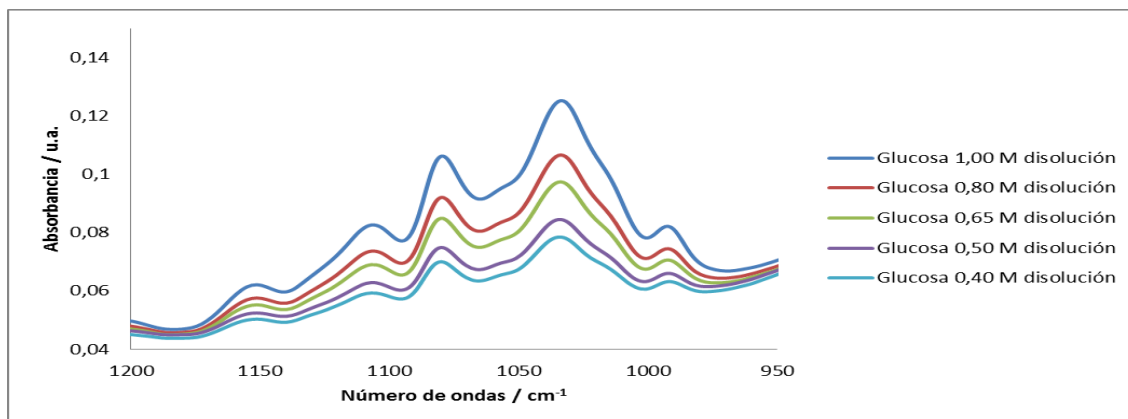
<sup>10</sup> J. Tewari y J. Irudayaraj, Quantification of saccharides in multiple floral honeys using fourier transform infrared microattenuated total reflectance spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.*, 52 (11), 2004, pp 3237-3243

<sup>11</sup> L.F. Leopold et al., Quantification of carbohydrates in fruit juices using FTIR spectroscopy and multivariate analysis. *Spectroscopy*, 26, 2011, pp 93-104.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1. Análisis Univariante

#### 5.1.1. Glucosa

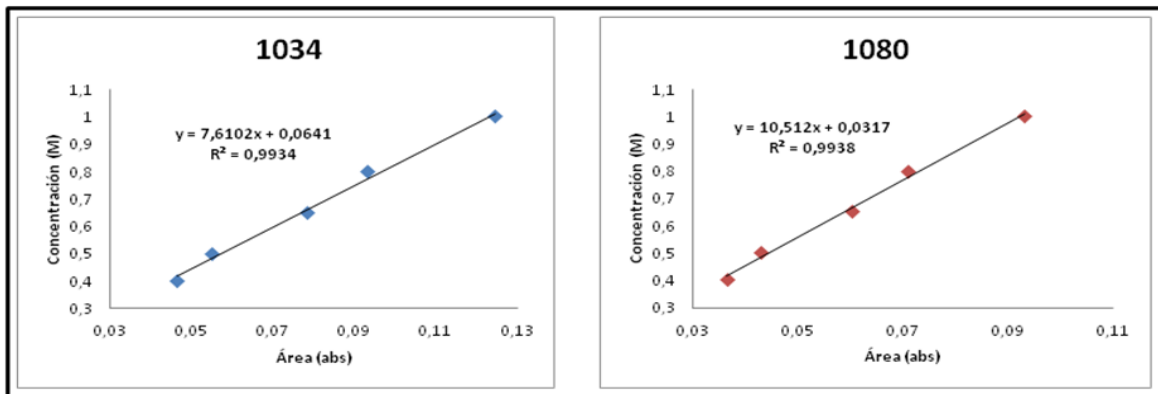


Gráfica 6. Espectros obtenidos para la glucosa en las distintas concentraciones

**Rectas de calibrado** para los números de ondas a los que se obtienen los picos característicos para la glucosa ( $1034$  y  $1080\text{ cm}^{-1}$ )<sup>10,11</sup>:

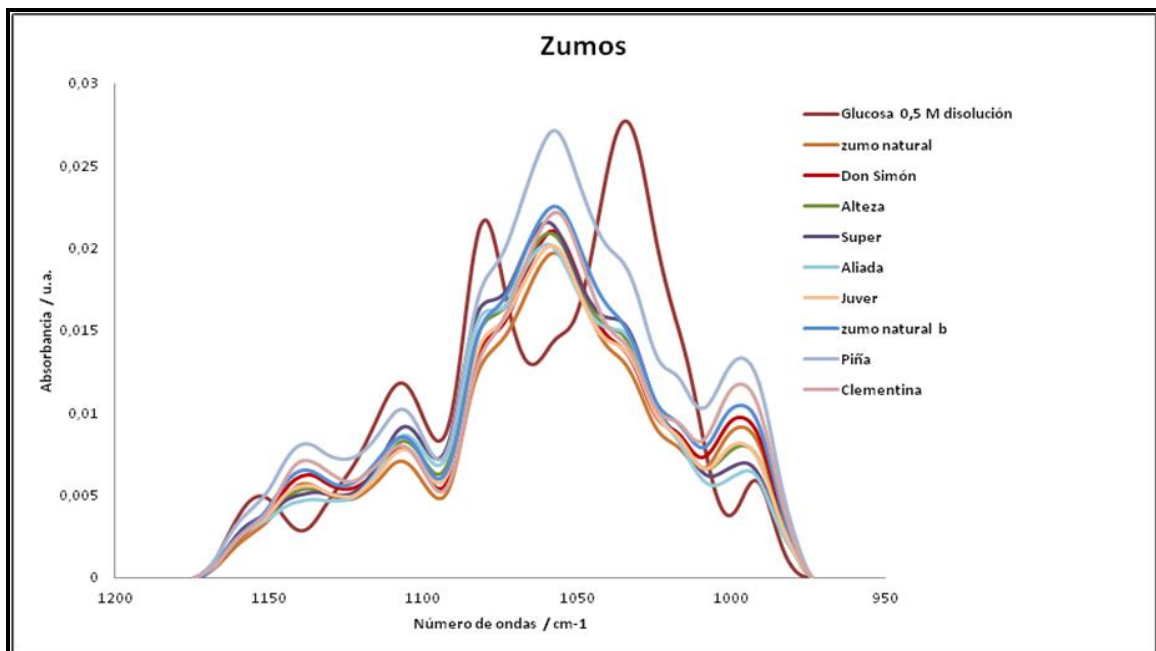
| [Glucosa] | 1034  | 1080  |
|-----------|-------|-------|
| 1,00      | 0,093 | 0,125 |
| 0,80      | 0,071 | 0,093 |
| 0,65      | 0,060 | 0,078 |
| 0,50      | 0,043 | 0,055 |
| 0,40      | 0,037 | 0,046 |

Tabla 9. Concentraciones y áreas calculadas para cada número de onda



Grafica 7. Calibrados para los número de ondas características de la glucosa

A modo de comparación, incorporamos los espectros obtenidos para los zumos junto al obtenido para la concentración de glucosa 0,5 M, obtenemos:



Grafica 8. Comparativa entre el espectro obtenido para los zumos y el obtenido para la glucosa 0,5 M. Los espectros se corrigen empleando una línea de base establecida entre los números de onda 973 y 1174  $\text{cm}^{-1}$

Todos tienen un perfil similar, con una concentración muy parecida a excepción del zumo de piña que a simple vista parece tener una mayor concentración.

Midiendo las áreas de los picos característicos de la glucosa en los zumos podemos estimar la concentración de glucosa mediante la técnica univariante, obteniendo los valores que se presentan a continuación:

| 1034                | Concentración (M) | Concentración (g/L) | g/100 mL |
|---------------------|-------------------|---------------------|----------|
| Zumo natural        | 0,26              | 47,06               | 4,71     |
| Zumo natural nevera | 0,30              | 53,18               | 5,32     |
| Don Simón           | 0,27              | 49,15               | 4,92     |
| Alteza              | 0,29              | 51,41               | 5,14     |
| Super               | 0,30              | 53,52               | 5,35     |
| Aliada              | 0,29              | 52,20               | 5,22     |
| Juver               | 0,27              | 49,32               | 4,93     |
| Piña                | 0,35              | 63,46               | 6,35     |
| Clementina          | 0,28              | 50,36               | 5,04     |

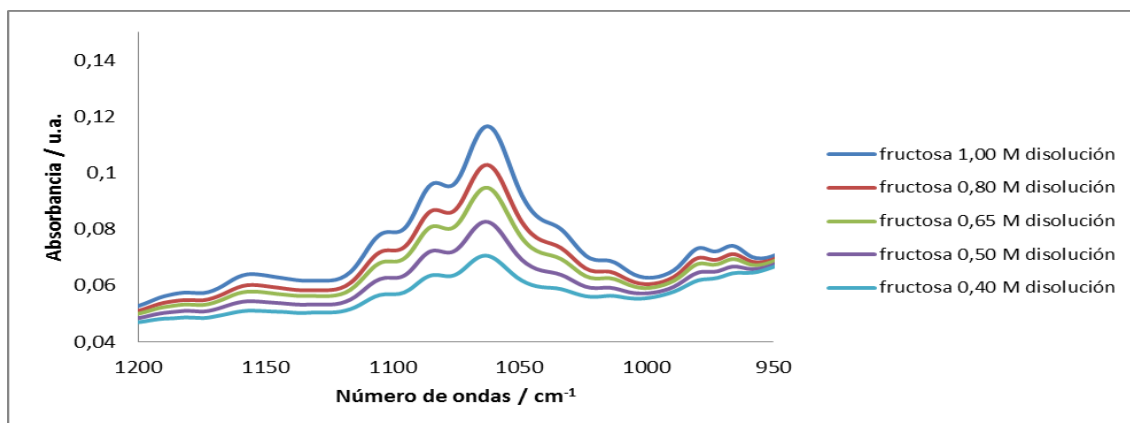
Tabla 10. Resultados obtenidos para la glucosa para un número de ondas de 1034 cm<sup>-1</sup>

| 1080                | Concentración (M) | Concentración (g/L) | g/100 mL |
|---------------------|-------------------|---------------------|----------|
| Zumo natural        | 0,30              | 54,90               | 5,49     |
| Zumo natural nevera | 0,35              | 63,66               | 6,37     |
| Don Simón           | 0,33              | 58,66               | 5,87     |
| Alteza              | 0,35              | 63,45               | 6,35     |
| Super               | 0,38              | 68,26               | 6,83     |
| Aliada              | 0,37              | 66,15               | 6,61     |
| Juver               | 0,33              | 60,12               | 6,01     |
| Piña                | 0,40              | 72,68               | 7,27     |
| Clementina          | 0,32              | 57,25               | 5,73     |

Tabla 11. Resultados obtenidos para la glucosa para un número de ondas de 1080 cm<sup>-1</sup>

Teniendo en cuenta la concentración estimada de glucosa en zumos, según los datos que figuran en las respectivas etiquetas, los valores obtenidos por este método son demasiado elevados. Asimismo comparando ambas rectas de calibrado podemos observar grandes diferencias entre los resultados.

## 5.1.2. Fructosa

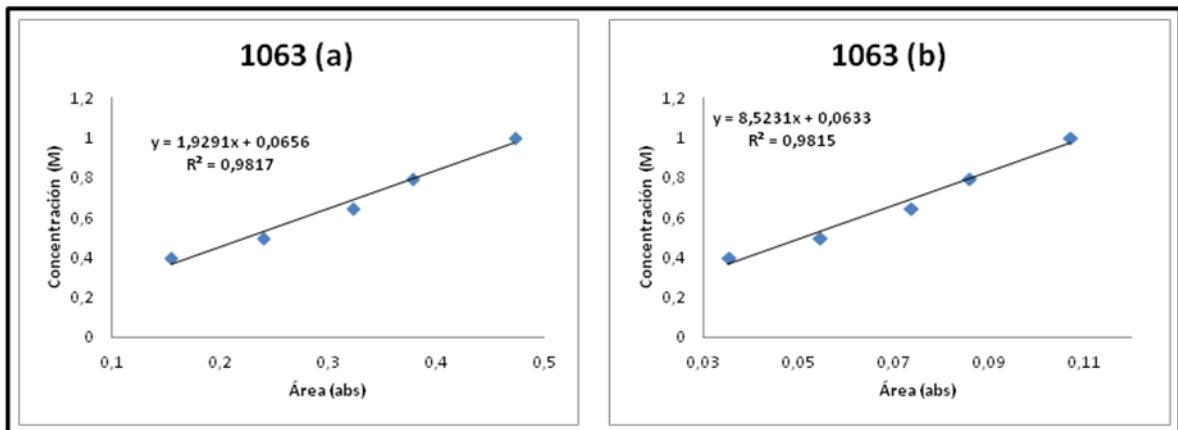


Grafica 9. Espectros obtenidos para la fructosa para las distintas concentraciones

**Rectas de calibrado** para el número de ondas al que se obtiene el pico característico de la fructosa (1063). En este caso procederemos de dos formas distintas, según la línea de base considerada, por un lado cogemos un área mayor que irá de 1052 a 1072  $\text{cm}^{-1}$  [1063(a)], por el otro cogemos un área menor que irá de 1062 a 1064  $\text{cm}^{-1}$  [1063(b)]<sup>10,11</sup>:

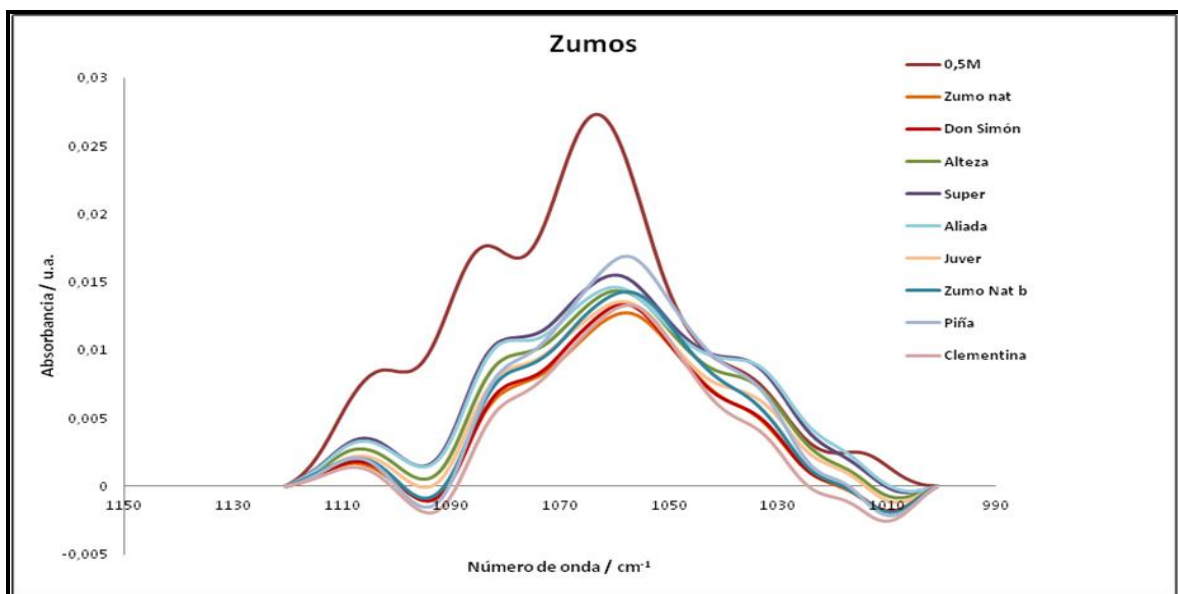
| [Fructosa] | 1063(a) | 1063(b) |
|------------|---------|---------|
| 1,00       | 0,472   | 0,107   |
| 0,80       | 0,378   | 0,086   |
| 0,65       | 0,323   | 0,073   |
| 0,50       | 0,239   | 0,054   |
| 0,40       | 0,154   | 0,035   |

Tabla 12. Concentraciones y áreas obtenidas para cada número de ondas



Grafica 10. Calibrados para los números de ondas característicos de la fructosa

Como en el caso anterior de la glucosa, se muestra a continuación una comparativa entre los espectros de los zumos y el espectro obtenido para la concentración de 0,50 M de fructosa:



Grafica 11. Comparativa entre el espectro obtenido para los zumos y el obtenido para la fructosa 0,5 M. Los espectros se corrigen empleando una línea de base establecida entre los números de onda 1000 y 1120  $\text{cm}^{-1}$

Al igual que para la glucosa, todos los zumos siguen un patrón similar y por lo tanto tendrán concentraciones de fructosa similares.

Nuevamente, se emplean las rectas de calibrado obtenidas para hacer una estimación de la concentración de fructosa en los zumos, obteniendo los siguientes resultados:

| 1063 (a)            | Concentración (M) | Concentración (g/L) | g/100 mL |
|---------------------|-------------------|---------------------|----------|
| Zumo Natural        | 0,27              | 49,11               | 4,91     |
| Zumo Natural Nevera | 0,30              | 54,26               | 5,43     |
| Don Simón           | 0,28              | 51,10               | 5,11     |
| Alteza              | 0,31              | 56,01               | 5,60     |
| Super               | 0,33              | 60,00               | 6,00     |
| Aliada              | 0,32              | 57,62               | 5,76     |
| Juver               | 0,29              | 53,03               | 5,30     |
| Piña                | 0,33              | 60,57               | 6,06     |
| Clementina          | 0,27              | 49,75               | 4,97     |

Tabla 13. Resultados obtenidos para la fructosa para un número de ondas de 1063(a)  $\text{cm}^{-1}$

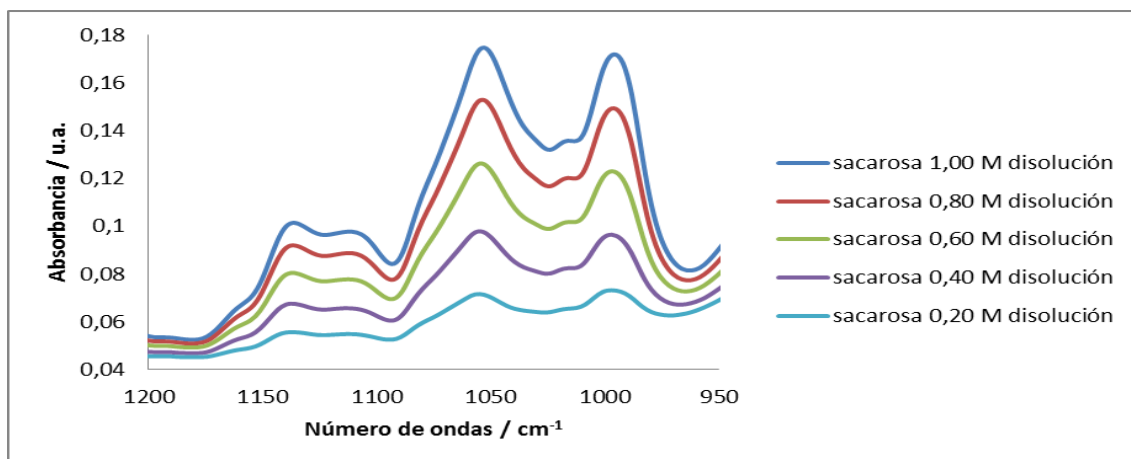
| 1063 (b)            | Concentración (M) | Concentración (g/L) | g/100 mL |
|---------------------|-------------------|---------------------|----------|
| Zumo Natural        | 0,26              | 47,17               | 4,72     |
| Zumo Natural Nevera | 0,29              | 52,07               | 5,21     |
| Don Simón           | 0,27              | 49,28               | 4,93     |
| Alteza              | 0,30              | 53,64               | 5,36     |
| Super               | 0,32              | 57,36               | 5,74     |
| Aliada              | 0,30              | 54,89               | 5,49     |
| Juver               | 0,28              | 50,46               | 5,05     |
| Piña                | 0,32              | 58,24               | 5,82     |
| Clementina          | 0,27              | 48,14               | 4,81     |

Tabla 14. Resultados obtenidos para la fructosa para un número de ondas de 1063(b)  $\text{cm}^{-1}$



Como en el caso anterior, la concentración obtenida es demasiado elevada si se compara con la concentración estimada.

### 5.1.3. Sacarosa

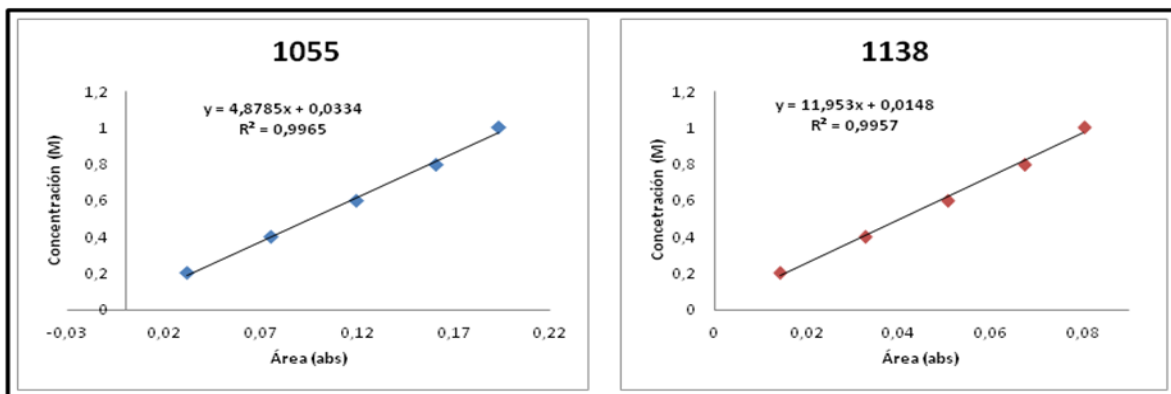


Grafica 12. Espectros obtenidos para la sacarosa para las distintas concentraciones

**Rectas de calibrado** para los números de ondas a los que se obtienen los picos característicos para la sacarosa ( $1055$  y  $1138 \text{ cm}^{-1}$ )<sup>10,11</sup>:

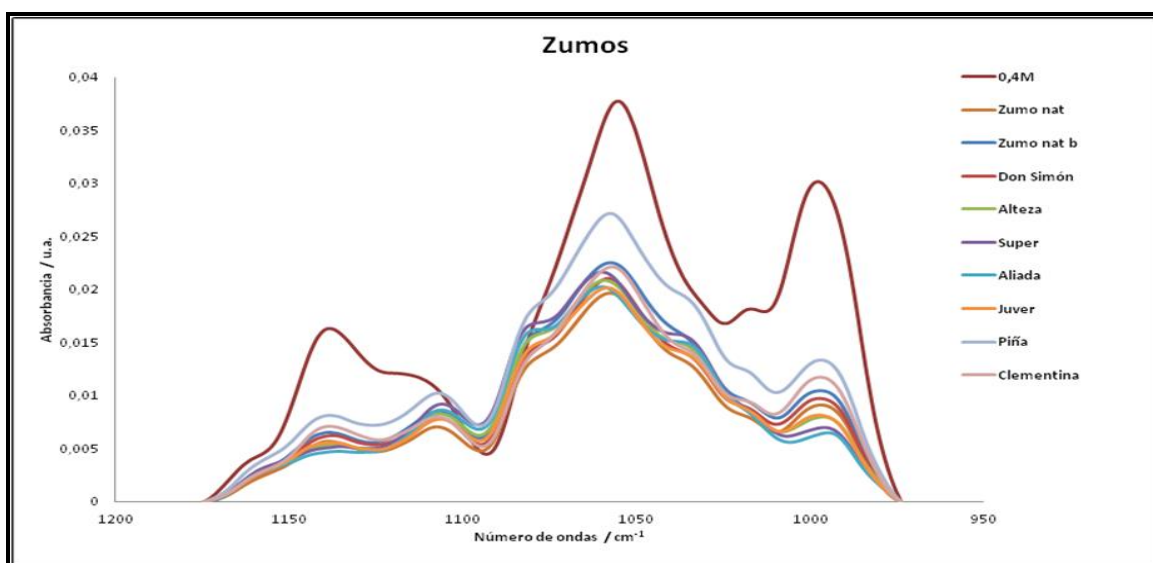
| [Sacarosa] | 1055  | 1138  |
|------------|-------|-------|
| 1,00       | 0,193 | 0,080 |
| 0,80       | 0,161 | 0,067 |
| 0,65       | 0,119 | 0,050 |
| 0,50       | 0,075 | 0,032 |
| 0,40       | 0,031 | 0,014 |

Tabla 15. Concentraciones y áreas obtenidas para cada número de ondas



Grafica 13. Calibrados para los números de ondas características de la sacarosa

Comparando los espectros de los zumos con los obtenidos para la concentración de 0,4 M para la sacarosa, se obtiene:



Grafica 14. Comparativa entre el espectro obtenido para los zumos y el obtenido para la sacarosa 0,4 M. Al igual que para los otros dos azúcares, todos los zumos siguen un patrón similar, a excepción de la piña que se destaca algo sobre los demás.

A continuación se muestran los resultados obtenidos para la concentración de sacarosa en zumos obtenida a partir de las rectas de calibrado anteriormente

descritas:

| 1055                | Concentración (M) | Concentración (g/L) | g/100 mL |
|---------------------|-------------------|---------------------|----------|
| Zumo natural        | 0,22              | 80,60               | 8,06     |
| Zumo natural nevera | 0,25              | 90,63               | 9,06     |
| Don Simón           | 0,23              | 84,82               | 8,48     |
| Alteza              | 0,23              | 83,80               | 8,38     |
| Super               | 0,24              | 85,18               | 8,52     |
| Aliada              | 0,22              | 80,75               | 8,08     |
| Juver               | 0,23              | 81,82               | 8,18     |
| Piña                | 0,29              | 106,57              | 10,66    |
| Clementina          | 0,25              | 89,44               | 8,94     |

Tabla 16. Resultados obtenidos para la sacarosa para un número de ondas de 1055 cm<sup>-1</sup>

| 1138                | Concentración (M) | Concentración (g/L) | g/100 mL |
|---------------------|-------------------|---------------------|----------|
| Zumo natural        | 0,15              | 54,38               | 5,44     |
| Zumo natural nevera | 0,17              | 61,46               | 6,15     |
| Don Simón           | 0,16              | 58,73               | 5,87     |
| Alteza              | 0,14              | 51,58               | 5,16     |
| Super               | 0,14              | 49,14               | 4,91     |
| Aliada              | 0,13              | 45,78               | 4,58     |
| Juver               | 0,15              | 53,32               | 5,33     |
| Piña                | 0,21              | 75,24               | 7,52     |
| Clementina          | 0,18              | 66,40               | 6,64     |

Tabla 17. Resultados obtenidos para la sacarosa para un número de ondas de 1138 cm<sup>-1</sup>

#### 5.1.4. Comparación con valores teóricos

Fijándonos en la tablas de las concentraciones obtenidas para los zumos en cada pico seleccionado para los distintos azúcares, vemos que hay variaciones en función del número de ondas que miremos (caso glucosa y sacarosa) y del procedimiento que sigamos (caso de la fructosa). Para llevar a cabo la comparación con los valores

teóricos, tomaremos los valores de las concentraciones más bajas obtenidas para cada azúcar.

| Zumos               | Glucosa (g/100mL) | Fructosa (g/100mL) | Sacarosa (g/100mL) | Total (g/100mL) | Teórico (g/100mL) |
|---------------------|-------------------|--------------------|--------------------|-----------------|-------------------|
| Zumo natural        | 4,71              | 4,72               | 5,44               | 14,86           | 9,9               |
| Zumo natural nevera | 5,32              | 5,21               | 6,15               | 16,67           | 9,9               |
| Don Simón           | 4,92              | 4,93               | 5,87               | 15,72           | 10                |
| Alteza              | 5,14              | 5,36               | 5,16               | 15,66           | 10,5              |
| Super               | 5,35              | 5,74               | 4,91               | 16,00           | 9,7               |
| Aliada              | 5,22              | 5,49               | 4,58               | 15,29           | < 15              |
| Juver               | 4,91              | 5,05               | 5,33               | 15,31           | 9,9               |
| Piña                | 6,35              | 5,82               | 7,52               | 19,69           | 8,8               |
| Clementina          | 5,04              | 4,81               | 6,64               | 16,49           | 9,5               |

Tabla 18. Valores obtenidos en comparación con los teóricos para cada zumo

Para la glucosa usamos los valores obtenidos al número de ondas de  $1034\text{ cm}^{-1}$ , para la fructosa  $1063(b)\text{ cm}^{-1}$  y para la sacarosa  $1138\text{ cm}^{-1}$ . Debemos sumar estos valores obtenidos para conocer la cantidad de azúcar total presente en los zumos. Usaremos los valores obtenidos para 100 mL, ya que normalmente los zumos nos dan las cantidades de azúcar para ese volumen.

Vemos que los resultados obtenidos están por encima de los valores teóricos para todos los zumos, esto puede ser debido a que en el análisis univariante tradicional sólo tiene en cuenta la contribución de uno de los azúcares y la concentración puede verse modificada por la presencia de los otros, dándonos valores superiores a los normales por solapamiento entre los picos característicos de cada azúcar.

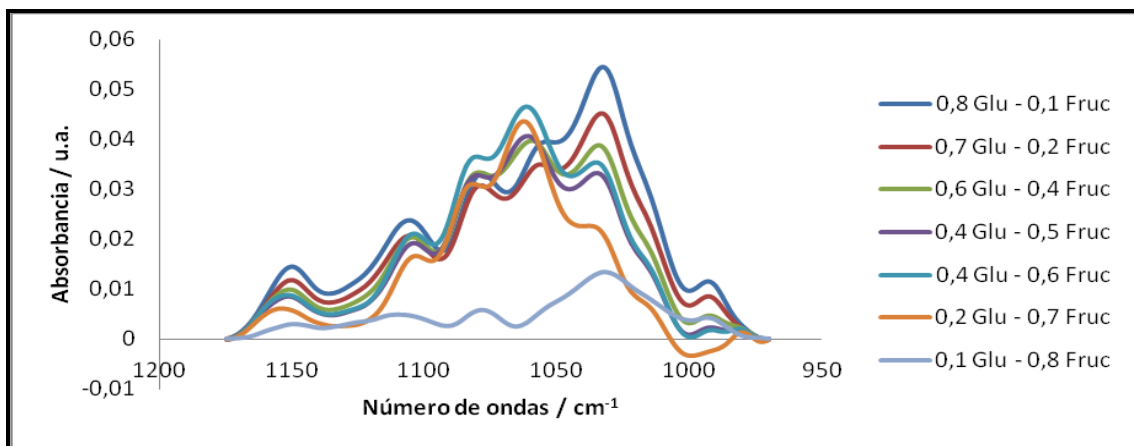
Además, basándonos en la bibliografía<sup>11</sup>, sabemos que las cantidades de glucosa suelen ser menores que las de fructosa en zumos naturales, y en este caso vemos que salen cantidades muy similares e incluso superiores para alguno de los zumos.

Esto nos lleva a plantearnos buscar la alternativa del análisis multivariante.

## 5.2. Análisis Multivariante

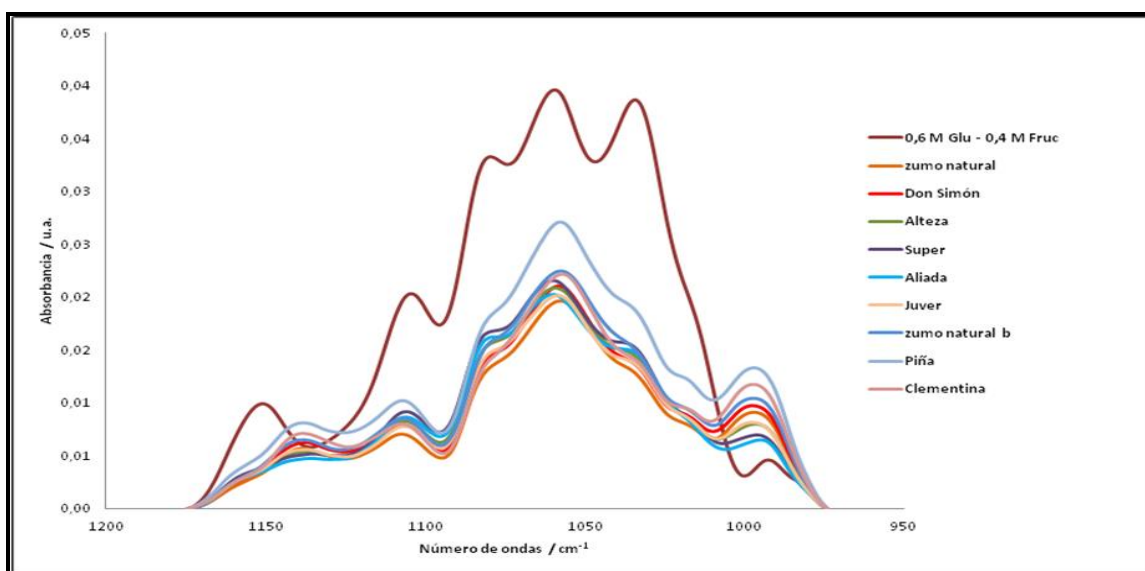
Para este tipo de análisis se tomaron los datos de las mezclas binarias previamente detalladas en apartados anteriores (ver Procedimientos).

### 5.2.1. Glucosa-Fructosa



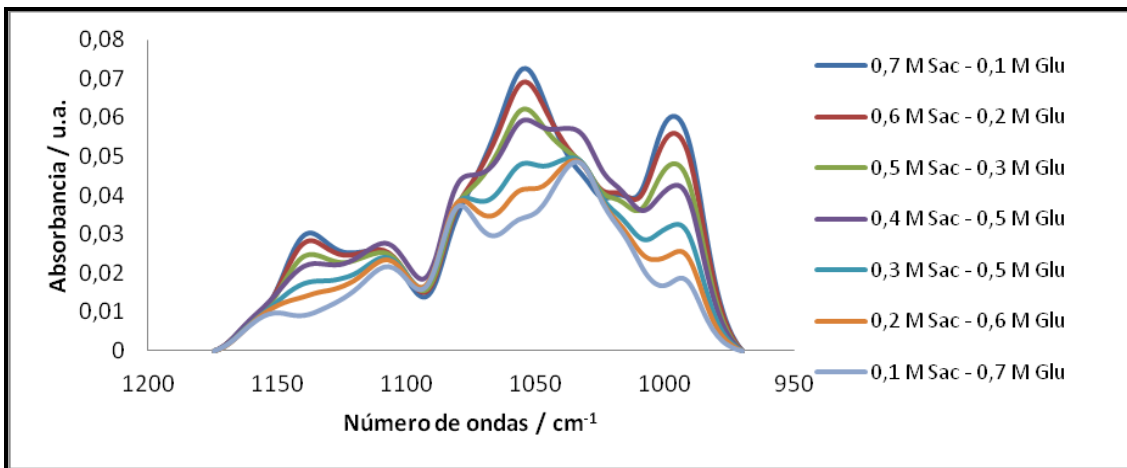
Grafica 15. Espectros obtenidos para la mezcla glucosa-fructosa para las distintas concentraciones

A modo de comparación, plasmamos en un mismo gráfico los espectros obtenidos para la Glucosa 0,60 M – Fructosa 0,40 M con los obtenidos para los zumos.



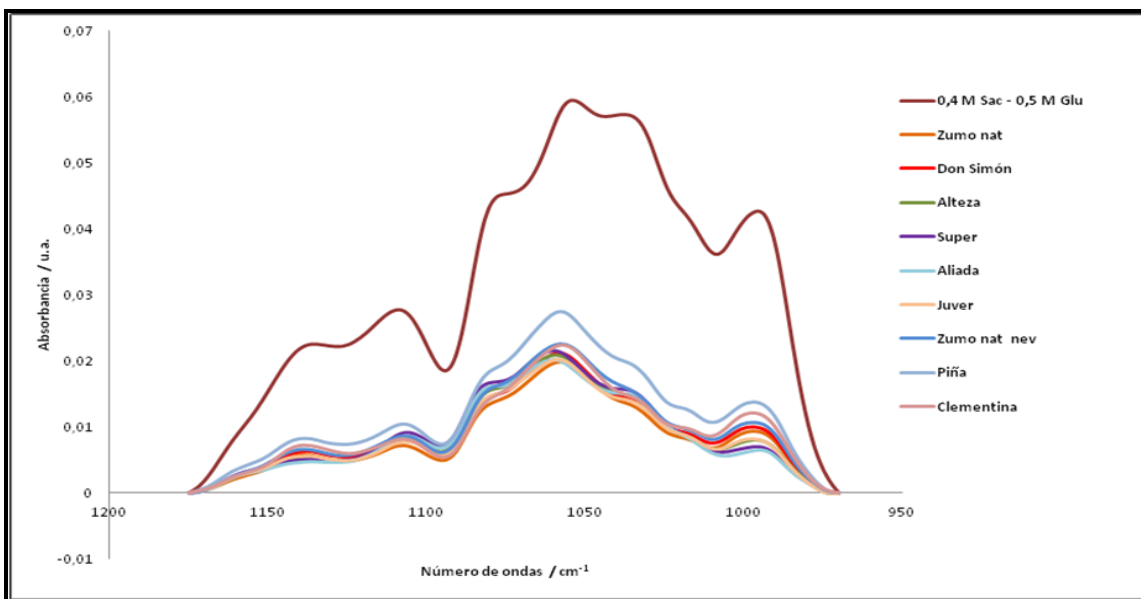
Grafica 16. Comparativa entre los espectros de los zumos y el de 0,60 M Glucosa-0,40 M Fructosa

## 5.2.2. Glucosa-Sacarosa



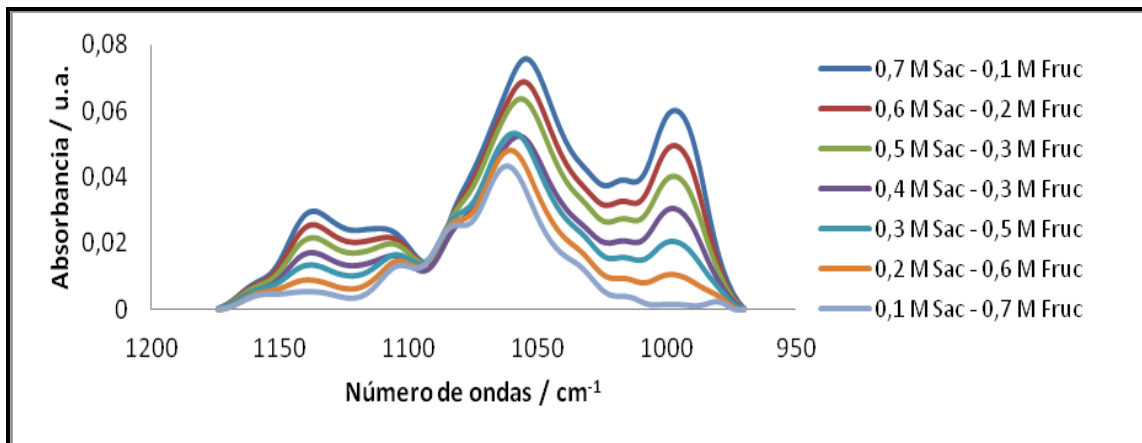
Grafica 17. Espectros obtenidos para la mezcla glucosa-sacarosa para las distintas concentraciones

A modo de comparación, plasmamos en un mismo gráfico los espectros obtenidos para la Glucosa 0,50 M – Sacarosa 0,40 M con los obtenidos para los zumos.



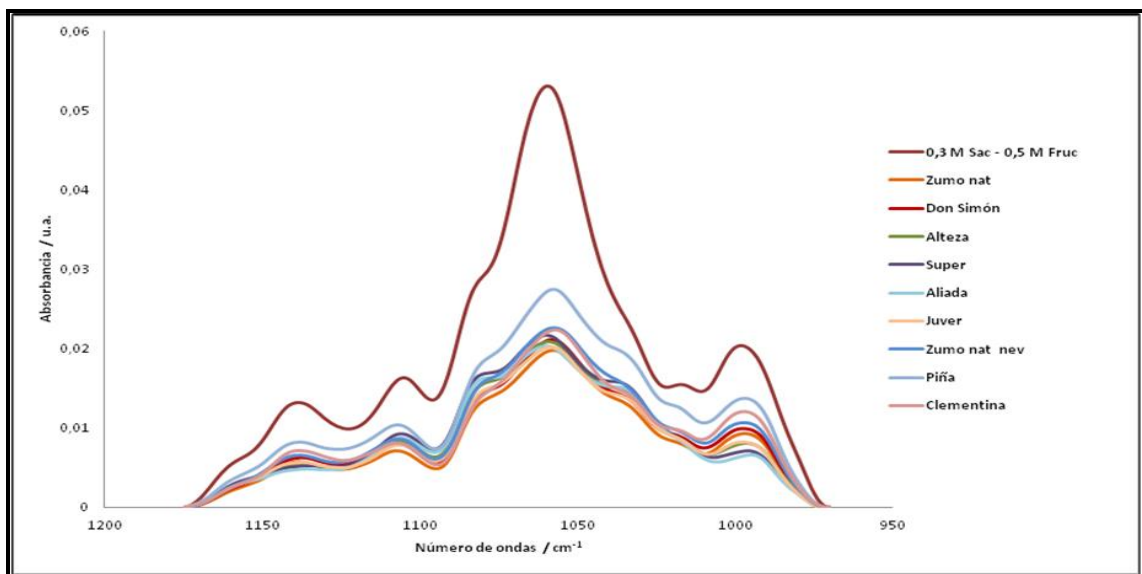
Grafica 18. Comparativa entre los espectros de los zumos y el de 0,50 M Glucosa-0,40 M Sacarosa

### 5.2.3. Fructosa-Sacarosa



Gráfica 19. Espectros obtenidos para la mezcla fructosa-sacarosa para las distintas concentraciones

A modo de comparación, plasmamos en un mismo gráfico los espectros obtenidos para la Sacarosa 0,50 M – Fructosa 0,30 M con los obtenidos para los zumos.



Gráfica 20. Comparativa entre los espectros de los zumos y el de 0,3 M Sacarosa-0,5 M Fructosa

## 5.2.4. Primera aproximación: valores máximos

Vamos a usar la disolución binaria de glucosa y fructosa:

| <u>Disoluciones</u> | <u>M1</u> | <u>M2</u> | <u>M3</u> | <u>M4</u> | <u>M5</u> | <u>M6</u> | <u>M7</u> |
|---------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Glucosa / M         | 0,8       | 0,7       | 0,6       | 0,4       | 0,4       | 0,2       | 0,1       |
| Fructosa / M        | 0,1       | 0,2       | 0,4       | 0,5       | 0,6       | 0,7       | 0,8       |

Necesitaremos también las áreas de absorbancia obtenidas para los números de onda que se corresponden con los máximos observados en la gráfica 15.

| <u>Disolución</u> | <u>M1</u> | <u>M2</u> | <u>M3</u> | <u>M4</u> | <u>M5</u> | <u>M6</u> | <u>M7</u> |
|-------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Pico 986 /u.a.    | 0,090300  | 0,066343  | 0,036580  | 0,019476  | 0,014985  | -0,017296 | -0,035385 |
| Pico 1034 /u.a.   | 0,656891  | 0,548665  | 0,472692  | 0,409825  | 0,436708  | 0,276317  | 0,214916  |
| Pico 1060 /u.a.   | 0,482829  | 0,444153  | 0,505280  | 0,511591  | 0,579777  | 0,516562  | 0,529541  |
| Pico 1082 /u.a.   | 0,259792  | 0,244722  | 0,276423  | 0,277635  | 0,311308  | 0,270323  | 0,269009  |
| Pico 1108 /u.a.   | 0,292386  | 0,250766  | 0,237085  | 0,218733  | 0,237149  | 0,174956  | 0,156493  |
| Pico 1050 /u.a.   | 0,143746  | 0,118357  | 0,102423  | 0,090362  | 0,094893  | 0,065357  | 0,054236  |

El siguiente paso es seleccionar dos de las concentraciones con sus correspondientes valores para cada pico para validar el modelo. Escogemos M3 (0,6 M Glucosa, 0,4 M Fructosa) y M5 (0,4 M Glucosa, 0,6 M Fructosa). El resto de datos serán el conjunto de entrenamiento y se emplearán para la calibración del modelo. Debemos introducir en el programa tanto las concentraciones como las áreas correspondientes para cada pico.

Una vez introducidos los datos del conjunto de entrenamiento, el programa nos da el número óptimo de factores que considera que debemos utilizar, además de la raíz cuadrada del error cuadrático medio para la validación cruzada (RMSECV) que es una medida de la capacidad del modelo para predecir las concentraciones, de muestras desconocidas.

En concreto para el ejemplo que estamos tratando, el número óptimo de factores para la medida de la glucosa es 2 y la RMSECV es 0,0383, cuanto menor sea este valor, menor será el error cometido al llevar a cabo la predicción. Para la fructosa, el número óptimo de factores es 4 y la RMSECV es 0,0109.



A continuación introducimos los datos que queremos que sean predichos donde incluimos exclusivamente las áreas de las concentraciones que vamos a emplear como validación y junto a ellas las áreas de los zumos cuyas concentraciones desconocemos. El resultado:

| Disolución            | M3                  | M5                |
|-----------------------|---------------------|-------------------|
| Glucosa / M real      | 0,6                 | 0,4               |
| Fructosa / M real     | 0,4                 | 0,6               |
| Glucosa / M predicha  | $0,516 \pm 0,003$   | $0,424 \pm 0,003$ |
| Fructosa / M predicha | $0,4166 \pm 0,0005$ | $0,611 \pm 0,002$ |

Tabla 19. Predicción de las concentraciones usadas para validación cruzada

|                | Zumo Natural<br>9,9 (g/100 mL) | Alteza<br>10,5 (g/100 mL) |
|----------------|--------------------------------|---------------------------|
| Pred. Glucosa  | $0,19 \pm 0,04$                | $0,21 \pm 0,04$           |
| Pred. Fructosa | <0                             | <0                        |

Tabla 20. Predicción a modo de ejemplo de dos zumos. 9,9 y 10,5 g /100 mL son los valores teóricos en azúcar total de los zumos.

El programa nos da los datos de **sensibilidad**, o capacidad del método para reconocer la mínima cantidad de sustancia buscada en un ensayo, y de **selectividad**, como la capacidad del método para distinguir entre el analito buscado y los que en ese momento actuarán como interferentes. Para este método:

| Glucosa               | Fructosa               |
|-----------------------|------------------------|
| Sensibilidad: 0,66395 | Sensibilidad: 0,073063 |
| Selectividad: 0,49867 | Selectividad: 0,065163 |

En este caso vemos que los resultados para la fructosa no se acercan a los reales puesto que estamos usando picos que no se corresponden con los característicos para los dos azúcares.

### 5.2.5. Segunda aproximación: valores teóricos<sup>10,11</sup>

Del conjunto de mezclas binarias preparadas para calibrar el modelo, se seleccionan dos (M3 Y M5 ) que se excluyen de las mezclas de calibración y se emplean para validar el modelo.

|                            | M3                |             | M5              |             |
|----------------------------|-------------------|-------------|-----------------|-------------|
|                            | Glucosa           | Fructosa    | Glucosa         | Fructosa    |
| Concentración real / M     | 0,403             | 0,605       | 0,602           | 0,403       |
| Concentración predicha / M | 0,44338 ± 0,00005 | 0,54 ± 0,04 | 0,5238 ± 0,0001 | 0,34 ± 0,04 |

Tabla 21. Valores de concentración para la mezcla glucosa-fructosa tomados para la validación

|                            | M10           |               | M12             |                 |
|----------------------------|---------------|---------------|-----------------|-----------------|
|                            | Glucosa       | Sacarosa      | Glucosa         | Sacarosa        |
| Concentración real / M     | 0,303         | 0,500         | 0,503           | 0,300           |
| Concentración predicha / M | 0,294 ± 0,001 | 0,520 ± 0,001 | 0,4934 ± 0,0005 | 0,3127 ± 0,0005 |

Tabla 22. Valores de concentración para la mezcla glucosa-sacarosa tomados para la validación

|                            | M17         |               | M19         |               |
|----------------------------|-------------|---------------|-------------|---------------|
|                            | Fructosa    | Sacarosa      | Fructosa    | Sacarosa      |
| Concentración real / M     | 0,301       | 0,500         | 0,502       | 0,300         |
| Concentración predicha / M | 0,31 ± 0,04 | 0,496 ± 0,001 | 0,49 ± 0,02 | 0,300 ± 0,001 |

Tabla 23. Valores de concentración para la mezcla fructosa-sacarosa tomados para la validación

Vemos que los valores son muy cercanos a las conocidas a excepción de la mezcla glucosa-fructosa donde nos salen valores aceptables de todas formas.

Para hacer la predicción de las concentraciones en los zumos, emplearemos como conjunto de calibración las áreas obtenidas para las concentraciones de las mezclas binarias no usadas para la validación.

Los resultados obtenidos para la glucosa son:

| Glucosa             | Concentración (M) | Concentración (g/L) | g/100 mL |
|---------------------|-------------------|---------------------|----------|
| Zumo natural        | 0,075 ± 0,001     | 13,51               | 1,35     |
| Zumo natural nevera | 0,093 ± 0,001     | 16,75               | 1,67     |
| Don Simón           | < 0               | -                   | -        |
| Alteza              | 0,1074 ± 0,0008   | 19,35               | 1,93     |
| Super               | 0,1346 ± 0,0003   | 24,25               | 2,42     |
| Aliada              | 0,1305 ± 0,0007   | 23,51               | 2,35     |
| Juver               | 0,0888 ± 0,0009   | 16,00               | 1,60     |
| Piña                | 0,1197 ± 0,0004   | 21,57               | 2,16     |
| Clementina          | 0,0598 ± 0,0005   | 10,77               | 1,08     |

Tabla 24. Valores obtenidos para la glucosa

El número de componentes principales óptimo: 4

RMSECV(Raiz cuadrada del error cuadrático medio para validación cruzada): 0,044976

Sensibilidad: 0,20142

Selectividad: 0,19651

Los resultados obtenidos para la fructosa son:

| Fructosa            | Concentración (M) | Concentración (g/L) | g/100 mL |
|---------------------|-------------------|---------------------|----------|
| Zumo natural        | 0,144 ± 0,002     | 25,94               | 2,59     |
| Zumo natural nevera | 0,166 ± 0,003     | 29,91               | 2,99     |
| Don Simón           | 2,0               | 360                 | 36       |
| Alteza              | 0,183 ± 0,005     | 32,97               | 3,30     |
| Super               | 0,203 ± 0,009     | 36,57               | 3,66     |
| Aliada              | 0,20 ± 0,01       | 36,03               | 3,60     |
| Juver               | 0,164 ± 0,04      | 29,55               | 2,95     |
| Piña                | 0,174 ± 0,002     | 31,35               | 3,13     |
| Clementina          | 0,135 ± 0,005     | 24,32               | 2,43     |

Tabla 25. Valores obtenidos para la fructosa

El número de componentes principales óptimo: 2

RMSECV(Raiz cuadrada del error cuadrático medio para validación cruzada): 0,26811

Sensibilidad: 0,22064

Selectividad: 0,20147

Los resultados para la sacarosa son:

| Sacarosa            | Concentración (M) | Concentración (g/L) | g/100 mL |
|---------------------|-------------------|---------------------|----------|
| Zumo natural        | 0,116 ± 0,001     | 41,80               | 4,18     |
| Zumo natural nevera | 0,133 ± 0,001     | 47,92               | 4,79     |
| Don Simón           | < 0               | -                   | -        |
| Alteza              | 0,1015 ± 0,0008   | 36,57               | 3,66     |
| Super               | 0,0904 ± 0,0004   | 32,57               | 3,26     |
| Aliada              | 0,0817 ± 0,0007   | 29,44               | 2,94     |
| Juver               | 0,1139 ± 0,0009   | 41,04               | 4,10     |
| Piña                | 0,1632 ± 0,0004   | 58,80               | 5,88     |
| Clementina          | 0,1551 ± 0,0006   | 55,89               | 5,59     |

Tabla 26. Valores obtenidos para la sacarosa

El número de componentes principales óptimo: 4

RMSECV(Raiz cuadrada del error cuadrático medio para validación cruzada): 0,024762

Sensibilidad: 0,1954

Selectividad: 0,17713

## 5.2.6. Comparación con valores teóricos

| Zumos               | Glucosa<br>(g/100mL) | Fructosa<br>(g/100mL) | Sacarosa<br>(g/100mL) | Total<br>(g/100mL) | Teórico<br>(g/100mL) |
|---------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|--------------------|----------------------|
| Zumo natural        | 1,35                 | 2,59                  | 4,18                  | 8,12               | 9,9                  |
| Zumo natural nevera | 1,67                 | 2,99                  | 4,79                  | 9,46               | 9,9                  |
| Don Simón           | -                    | 36                    | -                     | 36                 | 10                   |
| Alteza              | 1,93                 | 3,30                  | 3,66                  | 8,89               | 10,5                 |
| Super               | 2,42                 | 3,66                  | 3,26                  | 9,34               | 9,7                  |
| Aliada              | 2,35                 | 3,60                  | 2,94                  | 8,90               | < 15                 |
| Juver               | 1,60                 | 2,95                  | 4,10                  | 8,67               | 9,9                  |
| Piña                | 2,16                 | 3,13                  | 5,88                  | 11,17              | 8,8                  |
| Clementina          | 1,08                 | 2,43                  | 5,59                  | 9,10               | 9,5                  |

Tabla 27. Valores obtenidos en comparación con los teóricos para cada zumo

La cantidad de glucosa, fructosa y sacarosa determinadas es ligeramente inferior al valor mostrado en la etiqueta en todos los casos salvo el Don Simón y la Piña (en menor medida). Esto puede deberse, entre otras cosas, a un pequeño aporte de otros azúcares diferentes a fructosa, glucosa y sacarosa. Los datos obtenidos son, no obstante, coherentes con los datos registrados en bibliografía<sup>11</sup> estando la sacarosa en mayor cantidad y la glucosa en menor cantidad.

## 6. CONCLUSIONES

El uso de la espectroscopia FT-IR en combinación con métodos de análisis multivariantes es una buena herramienta para el análisis de los azúcares presentes en los zumos a la vista de los resultados obtenidos, en comparación con los métodos de análisis univariantes tradicionales.

Usando el análisis univariantes obtenemos resultados muy por encima de los consultados en la bibliografía<sup>11</sup>, además de unas proporciones entre los azúcares muy distintas a las esperadas.

Usando el método de mínimos cuadrados parciales (PLS) se obtienen predicciones que se asemejan mucho a los valores teóricos indicados en los envases de cada zumo y a los consultados en bibliografía<sup>11</sup>. Además los errores de predicción (RMSECV) son bajos para los tres azúcares analizados. Se obtienen también proporciones entre los azúcares muy cercanas a las esperadas.

Esta forma de trabajar nos permite conseguir resultados fiables de forma rápida, sencilla y es una herramienta rentable económicamente para monitorizar de manera rutinaria la calidad de los zumos.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Comisión del Codex Alimentarius (CODEX STAN 247-2005), [www.codexalimentarius.org](http://www.codexalimentarius.org), Última fecha de acceso: 03/07/2013
- [2] A. Úbeda Gallego, "Análisis del perfil de azúcares en la autenticación de zumos de frutas", PFC/TFG-Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agrónoma 2013, páginas 4-5, Univ. Politécnica de Cartagena.
- [3] Angel Gil-Izquierdo, María I. Gil and Federico Ferreres, *Effect of processing Techniques at Industrial Scale on Orange Juice Antioxidant and Beneficial Health Compound*, J. Agric. Food Chem., 50 (18), 2002, pp 5107-5114.
- [4] Pilar Ruiz Perez-Cacho and Rusell Rouseff, *Processing and Storage Effects on Orange Juice Aroma: A review*, J. Agric. Food Chem., 56 (21), 2008, pp 9785–9796.
- [5] Inyang UE. Abah UJ., *Chemical composition and organoleptic evaluation of juice from steamed cashew apple blended with orange juice*, Plants Foods for Human Nutrition, Volume 50, Issue 4, 1997, pp 295-300.
- [6] Thermo Nicolet Corporation, *Introduction to Fourier Transform Infrared Spectrometry*, 2001.
- [7] D.A. Skoog & J.J. Leary, *Análisis Instrumental*, McGraw-Hill, 4ª Ed, Cap. 12.
- [8] Richar B. Keithley, Michael L. Heien, R. Mark Wightman. *Multivariate Concentration determination using principal component regression with residual analysis*, Trend in Analytical Chemistry, 28 (9), 2009, pp 1127-1136.
- [9] Guillermo Ramis Ramos, Mª Celia García Álvarez-Coque, *Quimiometría*, Editorial Síntesis, 2001.
- [10] J. Tewari y J. Irudayaraj, *Quantification of saccharides in multiple floral honeys using fourier transform infrared microattenuated total reflectance spectroscopy*. J. Agric. Food Chem., 52 (11), 2004, pp 3237-3243.
- [11] L.F. Leopold et al., *Quantification of carbohydrates in fruit juices using FTIR spectroscopy and multivariate analysis*. Spectroscopy, 26 (2011) 93-104.



