

# UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA



## ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL

### **Uso de espectroscopia FTIR para la determinación de azúcares simples y ácidos en zumos y néctares de fruta**

TRABAJO FIN DE GRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

**ALUMNA:** CAROLINA TORRES MESA

**TUTOR:** PAU TALENS OLIAG

**DIRECTORA EXPERIMENTAL:** MARÍA JESÚS LERMA GARCÍA

**Curso Académico:** 2015/2016

**VALENCIA, Junio 2016**



## Uso de espectroscopia FTIR para la determinación de azúcares simples y ácidos en zumos y néctares de fruta.

### RESUMEN

En el presente trabajo se ha utilizado la espectroscopia FTIR (*Fourier-Transform Infrared Spectroscopy*) para la determinación de azúcares simples y ácidos orgánicos de diferentes zumos y néctares de fruta comerciales. Se trabajó con un total de 27 muestras de zumos (7 de manzana, 7 de naranja, 5 de piña y 8 de uva) y 11 muestras de néctares (2 de manzana, 4 de naranja y 5 de piña). En todas las muestras se determinó el contenido en azúcares simples (glucosa, fructosa y sacarosa) y el de los ácidos orgánicos más relevantes (tartárico, málico, isocítrico, cítrico y fumárico). Los azúcares se determinaron mediante cromatografía de intercambio iónico con un detector de pulsos amperométricos. Los ácidos orgánicos se determinaron por cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector ultravioleta-visible. Para la correcta separación de los patrones de los ácidos orgánicos se optimizaron las condiciones cromatográficas, tales como la temperatura y el caudal.

Posteriormente, a todas las muestras se les realizó un análisis no destructivo mediante un espectrofotómetro FTIR con ATR (*Attenuated Total Reflection*) como método de introducción de muestra. Se obtuvieron los espectros de las muestras en la región del infrarrojo medio (4000-400  $\text{cm}^{-1}$ ). De cada uno de los espectros se seleccionaron las 25 regiones que contienen la información más relevante. Las absorbancias normalizadas correspondientes a las áreas de los picos de estas regiones se utilizaron como variables predictoras del contenido en azúcares y ácidos, mientras que los datos obtenidos por cromatografía se utilizaron como variable respuesta. Mediante el software SPSS se realizó un análisis multivariante de forma que se obtuvieron modelos de regresión lineal múltiple, MLR (*Multiple Linear Regression*). Para la predicción del contenido de azúcares se obtuvieron valores de  $R^2$  y de error típico de estimación de 0,928 y 6,385  $\text{g L}^{-1}$ ; 0,951 y 6,276  $\text{g L}^{-1}$ ; 0,953 y 5,582  $\text{g L}^{-1}$ , para la glucosa, fructosa y sacarosa, respectivamente. Estos resultados indican que el modelo es adecuado para predecir la concentración de azúcares. Por el contrario, no se encontraron resultados tan satisfactorios para la predicción del contenido en ácidos. Además, se llevó a cabo un análisis discriminante lineal, LDA (*Linear Discriminant Analysis*) para evaluar la capacidad de los datos extraídos de los espectros FTIR para clasificar los zumos y néctares en base al tipo de fruta, obteniéndose un modelo capaz de distinguir el tipo de muestra con una alta capacidad de predicción (90%) y una Lambda de Wilks de 0,078.

**PALABRAS CLAVE:** FTIR, zumos, néctares, azúcares, ácidos orgánicos, análisis multivariante.

## Ús d' espectroscòpia FTIR per a la determinació de sucres simples i àcids en suc i nèctars de fruita.

### RESUM

En el present treball s'ha utilitzat l'espectroscòpia FTIR (*Fourier-Transform Infrared Spectroscopy*) per a la determinació de sucres simples i àcids orgànics de diferents suc i nèctars de fruita comercials. Es va treballar amb un total de 27 mostres de suc (7 de poma, 7 de taronja, 5 de pinya i 8 de raïm) i 11 mostres de nèctars (2 de poma, 4 de taronja i 5 de pinya). Es va determinar en totes les mostres el contingut en sucres simples (glucosa, fructosa i sacarosa) i dels àcids orgànics més rellevants (tartàric, màlic, isocítric, cítric i fumàric). Els sucres es van determinar per mitjà de cromatografia d'intercanvi iònic amb un detector de polsos amperomètrics. Els àcids orgànics es van determinar per cromatografia líquida d'alta resolució acoblada a un detector ultravioleta-visible. Per a la correcta separació dels patrons dels àcids orgànics es van optimitzar les condicions cromatogràfiques, com ara la temperatura i el cabal.

Posteriorment, es va realitzar una anàlisi no destructiva per mitjà d'un espectrofotòmetre FTIR amb ATR (*Attenuated Total Reflection*) com a mètode d'introducció de mostra a tots els suc i nèctars. Es van obtenir els espectres de les mostres en la regió de l'infraroig mig ( $4000-400\text{ cm}^{-1}$ ). De cada un dels espectres es van seleccionar les 25 regions que contenien la informació més rellevant. Les absorbàncies normalitzades corresponents a les àrees dels pics d'aquestes regions es van utilitzar com a variables predictores del contingut en sucres i àcids, mentre que les dades obtingudes per cromatografia es van utilitzar com a variable resposta. Per mitjà del programa SPSS es va realitzar una anàlisi multivariant de manera que es van obtenir models de regressió lineal múltiple MLR, (*Multiple Linear Regression*). Per a la predicció del contingut de sucres es van obtenir valors de  $R^2$  i d'error típic d'estimació de 0,928 i 6,385 g L<sup>-1</sup>; 0,951 i 6,276 g L<sup>-1</sup>; 0,953 i 5,582 g L<sup>-1</sup>, per a la glucosa, fructosa i sacarosa, respectivament. Aquests resultats indiquen que el model és adequat per a predir la concentració de sucres. Al contrari, no es van trobar resultats igual de satisfactoris per a la predicció del contingut en àcids. A més, es va dur a terme una anàlisi discriminant lineal, LDA (*Linear Discriminant Analysis*) per a avaluar la capacitat de les dades extretes dels espectres FTIR per a classificar els suc i nèctars basant-se en el tipus de fruita, obtenint-se un model que és capaç de distingir el tipus de mostra amb una alta capacitat de predicció (90%) i una Lambda de Wilks de 0,078.

**PARAULES CLAU:** FTIR, suc, nèctars, sucres, àcids orgànics, anàlisi multivariant.

## **Use of FTIR spectroscopy for the determination of simple sugars and acids in fruit juices and nectars.**

### **ABSTRACT**

In this project, FTIR spectroscopy (Fourier-Transform Infrared Spectroscopy) has been used for the determination of simple sugars and acids of different commercial juices and nectars. A total of 27 juice samples (7 of apple, 7 of orange, 5 of pineapple and 8 made of grape) and 11 nectars (2 of apple, 4 of orange and 5 made of pineapple) have been analyzed. The content of simple sugars (glucose, fructose and sucrose) and the most significant organic acids (tartaric, malic, isocitric, citric and fumaric) has been determined. Sugars were determined by ion-exchange chromatography coupled to a pulsed amperometric detector. Organic acids were determined by high performance liquid chromatography coupled to a UV-visible detector. For proper separation of the standards of organic acids, chromatographic conditions were optimized, working with different temperatures and flow rates.

Then, all samples were subjected to a nondestructive analysis by an FTIR spectrophotometer with ATR (Attenuated Total Reflection) as a method of sample introduction. Spectra of samples in the mid-infrared region ( $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$ ) were obtained. In each spectrum, 25 regions containing the most relevant information were selected. Normalized absorbances corresponding to the peak areas of these regions were used as predictors of sugars and acids, while the data obtained by chromatography was used as response variable. By multivariate analysis with software SPSS, Multiple Linear Regression (MLR) models were obtained. For each prediction of sugar content,  $R^2$  and standard error of the regression were obtained: 0.928 and  $6.385\text{ g L}^{-1}$ ; 0.951 and  $6.276\text{ g L}^{-1}$ ; 0.953 and  $5.582\text{ g L}^{-1}$  for glucose, fructose and sucrose respectively. These results indicate that the model is adequate for predicting the concentration of sugars. In contrast, results predicting acid content of samples were not as satisfactory. In addition, a Linear Discriminant Analysis (LDA) was performed in order to evaluate the capability of the data extracted from the FTIR spectra to classify juices and nectars based on the type of fruit. A model that is able to distinguish the type of simple was obtained, with high prediction capability (90 %) and a Wilks' Lambda value of 0.078.

**KEY WORDS:** FTIR, juices, nectars, sugars, organic acids, multivariate analysis.

## AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer en primer lugar a Pau Talens, por su dedicación y apoyo, ya que este proyecto no habría sido llevado a cabo sin su ayuda.

Agradecer a María Jesús todo el tiempo pasado en el laboratorio, su ayuda y su paciencia. Gracias por todo lo que he aprendido y los buenos ratos pasados.

Gracias también a Maribel y a Vicky por el tiempo que me han dedicado, por su ayuda y consejos.

Quiero agradecer a otras muchas personas su apoyo, ya que este trabajo y mi trayectoria no habrían sido posibles sin ellas.

A mis abuelos por haberme cuidado tanto.

A mi hermana por ser un buen ejemplo, por ser alguien en quien confiar.

A mi cuñado David, por su comprensión.

A mi padre, porque todas las oportunidades que he tenido son gracias a ti.

A mi prima Pilar, por ser la mejor compañera, por entendernos.

A Elena, Ania, María y Gema, por seguir a mi lado.

A mis M. por hacerlo todo más divertido.

A la gente que conocí en Praga y que todavía me hace ver las cosas distintas.

## ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1.	Legislación y tipos de zumos.....	1
1.2.	Composición química de los zumos de fruta.....	2
1.2.1.	Azúcares simples.....	3
1.2.2.	Ácidos orgánicos.....	4
1.3.	Adulteración y control de calidad de zumos.....	5
1.4.	Métodos de análisis de ácidos orgánicos y azúcares en zumos y néctares de fruta. ...	7
1.5.	Cromatografía Líquida.....	8
1.5.1.	Detectores.....	9
1.6.	Espectroscopia Infrarroja.....	10
1.6.1.	Espectrofotómetro FTIR y aplicaciones.....	11
1.7.	Análisis estadístico multivariante.....	12
1.7.1.	Análisis Discriminante lineal.....	13
1.7.2.	Regresión Lineal Múltiple.....	14
2.	OBJETIVOS.....	15
2.1.	Objetivo general.....	15
2.2.	Objetivos específicos.....	15
2.3.	Plan de trabajo.....	15
3.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
3.1.	Reactivos, estándares y disoluciones.....	16
3.2.	Muestras.....	16
3.3.	Instrumentación y condiciones de separación.....	18
3.4.	Tratamiento estadístico de los datos.....	19
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	20
4.1.	Determinación de azúcares en zumos y néctares de fruta mediante cromatografía iónica.....	20
4.2.	Determinación de ácidos orgánicos en zumos y néctares de fruta mediante HPLC de fase reversa.....	22
4.3.	Medida de los espectros FTIR de las muestras de zumo y néctares.....	27
4.4.	Clasificación de las muestras según el tipo de fruta mediante análisis discriminante lineal (LDA).....	28
4.5.	Cuantificación de azúcares en las muestras mediante regresión lineal múltiple (MLR).....	30

4.6. Cuantificación de ácidos orgánicos en las muestras mediante regresión lineal múltiple (MLR).....	33
5. CONCLUSIONES.....	36
6. REFERENCIAS.....	37

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1. Composición química aproximada de las frutas estudiadas en este proyecto (en % de peso fresco de la porción comestible) (Astiasarán y Martínez, 2003; Belitz et al., 2011).....	3
Tabla 3-1. Tabla de muestras de zumos y néctares de naranja y manzana utilizados en este estudio indicando la composición de los mismos y su código.....	17
Tabla 3-2. Tabla de muestras de zumos y néctares de piña y uva utilizados en este estudio indicando la composición de los mismos y su código.....	18
Tabla 4-1. Contenido en azúcares de las muestras de zumo y néctar analizadas en este estudio.....	22
Tabla 4-2. Contenido de los principales ácidos orgánicos de las muestras de zumo y néctar analizadas en este estudio.....	26
Tabla 4-3. Variables predictoras seleccionadas del modelo de LDA y sus correspondientes coeficientes estandarizados.....	30
Tabla 4-4. Parámetros de la regresión lineal múltiple (número de objetos en el conjunto de calibración, R <sup>2</sup> , error estimado y variables introducidas) para los modelos de predicción de concentraciones de glucosa, fructosa y sacarosa en los zumos y néctares estudiados.....	31
Tabla 4-5. Parámetros de la regresión lineal múltiple (número de objetos en el conjunto de calibración, R <sup>2</sup> , error estimado y variables introducidas) para los modelos de predicción de concentraciones de ácido tartárico, málico, isocítrico, cítrico y fumárico, en los zumos y néctares estudiados.....	33

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1. Estructura de los principales azúcares simples presentes en los zumos de fruta.....	4
Figura 1-2. Estructura de los principales ácidos orgánicos presentes en los zumos de fruta.....	5
Figura 1-3 Esquema de un sistema cromatográfico.....	8
Figura 4-1. Cromatogramas obtenidos para una muestra de (a) manzana (b) naranja (c) piña y (d) uva donde se muestran los perfiles de azúcares obtenidos. Condiciones experimentales: fase móvil, NaOH 100 mM; caudal 1 mL min <sup>-1</sup> , temperatura 25 °C; volumen de inyección 20 µL. Identificación de los picos: (1) glucosa (2) fructosa (3) sacarosa.....	21
Figura 4-2. Influencia de la temperatura en la separación de ácidos orgánicos utilizando (a) 40 °C, (b) 30 °C (c) 20 °C y (d) 15°C. Condiciones experimentales: fase móvil, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 25 mM a pH 2,4; caudal, 1 mL min <sup>-1</sup> ; volumen de inyección, 20 µL; detección, 210 nm. Identificación de los picos: (1) ácido oxálico, (2) ácido tartárico, (3) ácido málico, (4) ácido isocítrico, (5) ácido ascórbico, (6) ácido acético, (7) ácido cítrico y (8) ácido fumárico.....	24
Figura 4-3. Cromatogramas obtenidos para una muestra de (a) manzana (b) naranja (c) piña y (d) uva donde se muestran los perfiles de ácidos orgánicos obtenidos. Condiciones experimentales: temperatura, 15 °C. Otras condiciones e identificación de los picos como en la Figura 4-2.....	25
Figura 4-4. Espectros FTIR para muestras de (a) manzana (b) naranja (c) piña (d) uva.....	28
Figura 4-5. Gráfico de puntuaciones en un plano oblicuo del espacio tridimensional definido por las tres funciones discriminantes del modelo LDA construido para discriminar entre muestras provenientes de diferentes frutas, para muestras de (a) manzana (b) naranja (c) piña (d) uva.....	29
Figura 4-6. Gráficos de valores predichos por el modelo de MLR versus los valores observados para la glucosa, fructosa y sacarosa. Los objetos en color verde pertenecen al conjunto de calibración mientras que los etiquetados en color azul pertenecen al conjunto de evaluación.....	32
Figura 4-7. Gráficos de valores predichos por el modelo de MLR versus los valores observados para la glucosa, fructosa y sacarosa. Los objetos en color verde pertenecen al conjunto de calibración mientras que los etiquetados en color azul pertenecen al conjunto de evaluación.....	35

## 1. INTRODUCCIÓN.

### 1.1. Legislación y tipos de zumos.

Dentro del Código Alimentario (Codex Stan 247-2005, Codex Alimentarius) definido por la FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura) y la OMS (Organización Mundial de la Salud) existe un código específico en el que se definen las características de los zumos y los métodos analíticos a utilizar para asegurar la calidad y autenticidad de los mismos. Este código es el Codex Stan 247-2005. Según éste y según las disposiciones a nivel nacional: Real Decreto (RD) 1050/2003 (BOE núm. 184, de 2 de agosto de 2003, páginas 29970 a 29974) y los siguientes RD 1518/2007 (BOE núm. 294, de 8 de diciembre de 2007, páginas 50632 a 50639) y RD 462/2011 (BOE núm. 85, de 9 de abril de 2011, páginas 36807 a 36809) los zumos de frutas disponibles en el mercado se clasifican en:

- **Zumo de frutas:** Producto susceptible de fermentación, pero no fermentado, obtenido a partir de frutas sanas y maduras, frescas o conservadas por el frío, de una o varias especies, que posea el color, el aroma y el sabor característicos de los zumos de la fruta de la que procede. Se podrá reincorporar al zumo el aroma, la pulpa y las celdillas que haya perdido con la extracción.
- **Zumo de frutas a base de concentrado:** Designa el producto obtenido mediante la incorporación al zumo de frutas concentrado de la cantidad de agua extraída al zumo en el proceso de concentración y la restitución de los aromas, y en su caso, la pulpa y celdillas perdidas del zumo, pero recuperados en el proceso de producción del zumo de frutas de que se trate o de zumos de frutas de la misma especie. El agua añadida deberá presentar las características adecuadas, especialmente desde el punto de vista químico, microbiológico y organoléptico, con el fin de garantizar las propiedades esenciales del zumo.
- **Néctar de fruta:** Se refiere al producto susceptible de fermentación, pero no fermentado, obtenido por adición de agua y de azúcares y/o miel, a los productos de zumo definidos anteriormente y al puré de frutas o a una mezcla de estos productos. La adición de azúcares y/o miel se autoriza en una cantidad no superior al 20% del peso total del producto acabado. Podrán añadirse sustancias aromáticas, componentes aromatizantes volátiles, pulpa y células, todos los cuales deberán proceder del mismo tipo de fruta y obtenerse por procedimientos físicos. En el caso de la elaboración de néctares de frutas sin

azúcares añadidos o de valor energético reducido, los azúcares podrán sustituirse total o parcialmente por edulcorantes.

Productos a base de fruta no tan comunes son, por ejemplo, el zumo de frutas deshidratado o en polvo; que es el producto obtenido a partir de zumo de frutas de una o varias especies por eliminación física de la práctica totalidad del agua. También, el puré de fruta utilizado en la elaboración de zumos y néctares de frutas: producto sin fermentar, pero fermentable, obtenido mediante procedimientos como el tamizado, triturado o desmenuzado de la parte comestible de la fruta entera o pelada sin eliminar el zumo. Así, la legislación recoge más tipos de zumos y productos a base de fruta existentes en el mercado.

En relación con el cumplimiento de esta legislación, la producción de zumos en la UE se rige por el Código de Buenas Prácticas de la Asociación de la Industria de Zumos y Néctares de Frutas y Vegetales de la Unión Europea (AIJN). Este código se reconoce como modelo para la industria del sector por la Comisión Europea y regula la calidad y las especificaciones de los zumos y bebidas de frutas relacionadas, así como las directrices para comprobar su autenticidad (AIJN, 2010).

Además, existen otras asociaciones en la industria como la Federación Internacional de Productores de Zumos de Frutas (IFU) y a nivel nacional la Asociación Española de Fabricantes de Zumos (ASOZUMOS). En España, además, siguiendo el modelo de otros países, existe la Asociación Española para el Autocontrol de Zumos y Néctares (AEAZN) que combate el fraude y la adulteración a través de un control exhaustivo de la calidad y la autenticidad de los productos y fomenta así una competencia libre y leal entre las empresas que la forman.

## **1.2. Composición química de los zumos de fruta.**

El componente mayoritario de los zumos de frutas es el agua, seguido de los azúcares simples glucosa, fructosa y sacarosa (Muntean, 2010). Contienen además ácidos, proteínas y lípidos en muy pequeña proporción, así como otros componentes secundarios que poseen importancia debido a su valor sensorial (pigmentos, compuestos aromáticos, compuestos fenólicos astringentes), nutritivo (vitaminas, minerales, fibra) o que influyen notablemente en su consistencia, como las pectinas.

En la Tabla 1-1 se muestran los principales componentes de las especies de fruta contemplados en esta memoria, sin embargo, estos se deben tomar como valores aproximados ya que la composición química de las frutas es variable y depende de factores como la especie, la variedad, el tipo de cultivo, la zona, el clima y del grado de maduración del fruto.

**Tabla 1-1. Composición química aproximada de las frutas estudiadas en este proyecto (en % de peso fresco de la porción comestible) (Astiasarán y Martínez, 2003; Belitz *et al.*, 2011)**

<b>Fruta</b>	<b>Agua (g/100g)</b>	<b>Azúcares totales (g/100g)</b>	<b>Acidez (g/100g)</b>	<b>Fibra (g/100g)</b>	<b>Proteína (g/100g)</b>	<b>Ceniza (g/100g)</b>
Manzana	85,7	11,1	0,6	2,1	0,3	0,3
Naranja	88,6	8,3	1,1	1,6	0,8	0,5
Piña	86,8	12,3	0,7	1,0	0,5	0,4
Uva	82,3	15,2	0,9	1,5	0,6	0,5

Podemos considerar que esta composición corresponde además a zumos si estos provienen exclusivamente de la fruta exprimida. De entre todos los componentes encontrados en los zumos de fruta, en esta memoria nos vamos a centrar en los azúcares simples y los ácidos orgánicos, debido a que son componentes mayoritarios de los zumos, y a su importancia dentro de los parámetros de autenticidad en las legislaciones existentes.

### **1.2.1. Azúcares simples.**

Los azúcares, muy importantes en los zumos y néctares, son carbohidratos simples, cristalinos, solubles en agua y generalmente tienen un sabor dulce. Los azúcares pueden estar formados por una sola molécula o por la unión de varios monómeros. Estos monómeros son aldehídos o cetonas alifáticas que contienen un grupo carbonilo y uno o varios grupos hidroxilos. La mayoría de los monosacáridos naturales contienen 5 (pentosas) o 6 (hexosas) átomos de carbono en su estructura. Los disacáridos consisten en la unión de dos monosacáridos mientras que los trisacáridos están formados por tres monómeros. Los oligosacáridos son polímeros de monosacáridos de relativa baja masa molecular, mientras que uniones superiores de monosacáridos formando polisacáridos de alto peso molecular forman los llamados carbohidratos complejos. Los azúcares simples mayoritariamente presentes en las frutas son la sacarosa, la glucosa y la fructosa (sus estructuras químicas se muestran en la

Figura 1-1). Otros azúcares, como la xilosa, la arabinosa o la manosa, se encuentran en menor proporción, con algunas excepciones. El contenido en azúcares simples varía en función de la fruta y también debido a otros factores como el tipo de cultivo o la radiación.

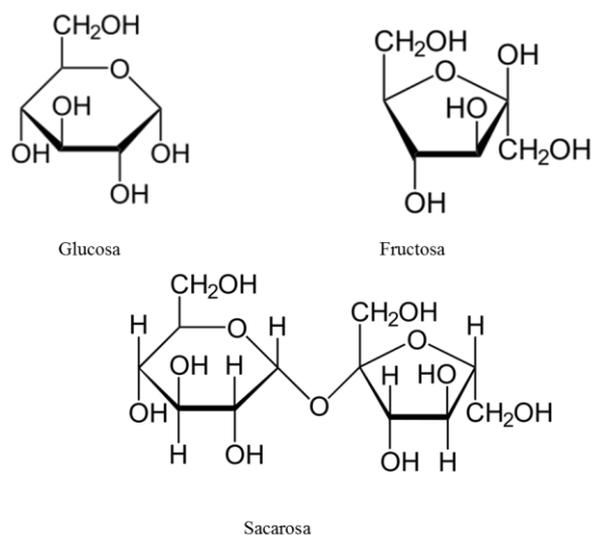
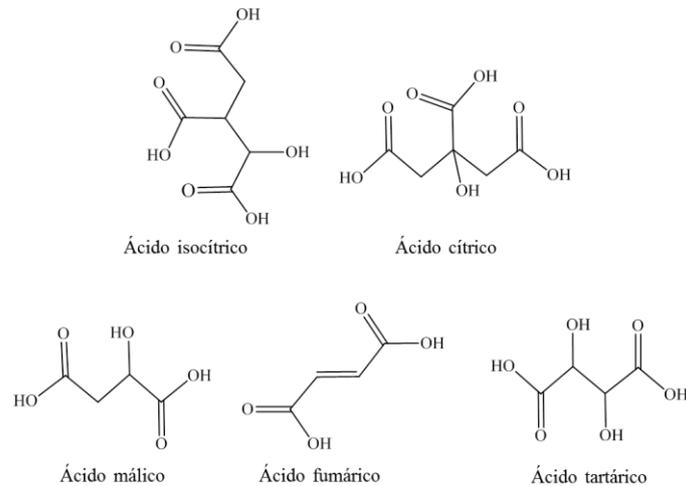


Figura 1-1. Estructura de los principales azúcares simples presentes en los zumos de fruta.

### 1.2.2. Ácidos orgánicos.

Son cadenas de hidrocarburos que se caracterizan por tener uno o más grupos carboxilo. En este grupo funcional coinciden sobre el mismo carbono de la molécula, un grupo hidroxilo y un grupo carbonilo. Estos compuestos tienen propiedades ácidas débiles y son solubles en agua. Éstos pueden encontrarse tanto en forma libre como en forma de sales con cationes inorgánicos. En el zumo de naranja, por ejemplo, el 80% del ácido cítrico está en forma libre, y el resto en su mayor parte, como citrato ácido de potasio (Primo-Yúfera, 1982). Los ácidos más predominantes en frutas como la naranja, la mandarina o la piña son los ácidos cítrico y málico, mientras que en las uvas el ácido tartárico. En el caso del ácido málico, este es el que predomina en ciruelas, cerezas y manzanas, llegando en algunos casos al 90% de los ácidos totales. La acidez en los zumos varía en función de factores como variedad, zona y tipo de cultivo, maduración de las frutas, etc.

En la Figura 1-2 se muestran las estructuras de algunos de los ácidos orgánicos más abundantes en los zumos de frutas.



**Figura 1-2. Estructura de los principales ácidos orgánicos presentes en los zumos de fruta.**

La cuantificación de azúcares simples y ácidos orgánicos es importante porque son esenciales en la evaluación de la calidad y en la autenticación de los zumos y otros productos derivados de las frutas. Estos parámetros son recogidos en guías internacionalmente aceptadas como las de la AIJN.

### 1.3. Adulteración y control de calidad de zumos.

La adulteración de alimentos y bebidas por motivos económicos es un problema emergente y cada vez más recurrente en la industria agroalimentaria. Todos los productos alimenticios que son blanco de adulteración son productos de alto valor comercial y/o producidos en gran volumen (Cordella *et al.*, 2002).

Los zumos de frutas son ampliamente consumidos en todo el mundo por diferentes grupos de edad y su consumo ha aumentado rápidamente en las últimas dos décadas (Szymczycha-Madeja *et al.*, 2014), por lo que se ha generado un amplio mercado para estos productos. Los precios de los zumos de frutas de alta calidad se consideran objetivo para la adulteración. Especialmente los zumos de naranja y de uva estaban entre los siete alimentos clave que se han considerado como objetivo para la adulteración desde los años 80 (Moore *et al.*, 2012); por eso, entre otros criterios, han sido introducidos en este estudio. Un fraude frecuente es comercializar un zumo que se vende como puro a alto precio, de un solo tipo de fruta cuando ha sido mezclado con otros zumos más baratos provenientes de otras frutas. Por otra parte, otras manipulaciones que se suelen hacer es añadir agua para aumentar su volumen, añadir azúcar o ácidos orgánicos que no son especificados en la etiqueta. Además, se llevan a cabo

otras correcciones fraudulentas que enmascaran la calidad real del producto como puede ser la adición de carotenoides a zumos con coloración deficiente o la adición de azúcar a zumos demasiado ácidos. La necesidad de frenar estas malas prácticas ha hecho necesario disponer de metodologías de gran fiabilidad para esclarecer la pureza de los zumos de frutas comercializados. Para evaluar y evitar el fraude en los zumos de frutas es imprescindible la determinación analítica de diversos compuestos químicos mediante diferentes técnicas analíticas. Con el objeto disponer de una guía adecuada para evaluar las diferencias entre zumos adulterados y los no adulterados y realizar un control preciso de la calidad de estos productos el *Codex Alimentarius* ha determinado una serie de parámetros microbiológicos y fisicoquímicos que se deben de comparar y que sirven de referencia en la industria. Entre ellos se encuentran el perfil de azúcares y oligosacáridos de los zumos, el pH, la acidez valorable, el contenido de vitamina C, ácido málico y otros ácidos orgánicos, la fermentabilidad, el contenido en pectina, los grados Brix, el contenido en minerales, el índice de formol (en relación con la madurez de la fruta de la que proviene), aminoácidos libres, tipo de aromas y su concentración, etc.

Debido a la diversidad de las adulteraciones, la medida de varios parámetros es fundamental. Por ejemplo, en primer lugar, la presencia y proporción de ácidos orgánicos en los zumos de frutas puede afectar a las características químicas, organolépticas y microbiológicas de este producto, por ello es necesario su identificación y cuantificación. Cada zumo de fruta tiene un perfil de ácidos orgánicos distinto que puede ser usado como “huella dactilar” para verificar su autenticidad (Saavedra *et al.*, 2000). En esta línea encontramos que el ácido tartárico es generalmente considerado un indicador de la adición de zumo de uva a un zumo más caro (Ehling y Cole, 2011). Del mismo modo, el exceso de ácido málico y / o ácido quínico se pueden utilizar como un indicador de adición de zumo de manzana (Ehling y Cole, 2011). El isocitrato que existe en el zumo de naranja en concentraciones pequeñas pero constantes puede servir como un indicador de adulteración. También puede ser concluyente, por otro lado, que mientras en la fruta fresca los niveles de ácido cítrico decrecen con la maduración, los de ácido málico se mantienen constantes (Saavedra *et al.*, 2000).

La realización de ciertas adulteraciones como una dilución con agua, así como la adición de azúcares, el lavado de la pulpa y la adición de otros zumos más económicos (Jandric *et al.*, 2014; Saavedra *et al.*, 2000; Ashurst , 2005; Muntean, 2010; Simpkins y Harrison, 1995) conlleva un cambio en la cantidad de azúcares presentes en el zumo de fruta. La adición de azúcar se comprueba mediante la cuantificación de los niveles de sacarosa, glucosa y fructosa

que hay presentes en el zumo. La concentración relativa de azúcares debe que encontrarse dentro de los niveles establecidos por las AIJN (AIJN, 2010) para los diferentes tipos de frutas. Con ello, no solo podemos establecer la autenticidad, sino también evaluar la calidad y el control de la posible alteración microbiológica que puede haber sufrido durante el almacenamiento (Muntean, 2010; Martínez-Montero *et al.*, 2004); por otra parte, y dado que los azúcares tienen también un efecto sobre los valores nutricionales de los zumos, hay que tener cuidado ya que podrían tomarlos personas con diabetes (Kelly y Downey, 2005; Karadeniz y Eksi, 2002).

#### **1.4. Métodos de análisis de ácidos orgánicos y azúcares en zumos y néctares de fruta.**

Los métodos analíticos empleados para la determinación de ácidos orgánicos en zumos de frutas, con el fin de su autenticación y control de calidad; han sido principalmente enzimáticos, cromatográficos y por electroforesis capilar. Los métodos enzimáticos (Stój *et al.*, 2006) necesitan de kits específicos para cada uno de los ácidos orgánicos o para cada azúcar presentes; utilizan cantidades grandes de reactivo y son procedimientos lentos, y suelen no ser rentables económicamente. Por otro lado, los métodos cromatográficos (tanto cromatografía líquida como cromatografía de gases) han sido ampliamente utilizados tanto para la determinación de ácidos orgánicos (Chinnici *et al.*, 2005; Pereira *et al.*, 2010; Cunha y Fernandes, 2002; Ehling y Cole, 2011; Kelebek *et al.*, 2009; Scherer *et al.*, 2012; Shui y Leong, 2002), como para la determinación de azúcares simples (Chinnici *et al.*, 2005; Kelebek *et al.*, 2009). Sin embargo, aunque ofrecen resultados precisos, son lentos, requieren una alta cualificación del personal y generan muchos residuos, además de ser caros. Por otro lado, para la aplicación de muchos de ellos es necesario una derivatización de la muestra, un proceso largo y costoso, la utilización de disolventes orgánicos o de resinas (Cunha y Fernandes, 2002). Respecto a la electroforesis capilar, también es frecuente para el análisis, sobre todo, de ácidos orgánicos (Saavedra *et al.*, 2001; Mato *et al.*, 2006).

Sin embargo, es necesario desarrollar técnicas más rápidas y fiables para la cuantificación de estos parámetros de cara a la autenticación y detección de adulteraciones en los zumos de frutas.

## 1.5. Cromatografía Líquida.

La cromatografía es definida por la IUPAC como un método utilizado para la separación de los componentes de una muestra en la cual estos se distribuyen en dos fases, una de las cuales es estacionaria mientras que la otra se mueve (Hernández-Hernández y González-Pérez, 2002). La fase estacionaria puede ser un sólido, un líquido sobre un soporte sólido, o un gel. La fase estacionaria puede estar contenida en una columna, extendida en capa o dispuesta en forma de película. La fase móvil puede ser gaseosa o líquida. Como se muestra en la Figura 1-3 cualquier sistema cromatográfico está compuesto de, al menos, un sistema de bombeo, un dispositivo para la introducción de la muestra o inyector, una columna, un detector y, finalmente, el sistema adecuado de adquisición de datos y control.

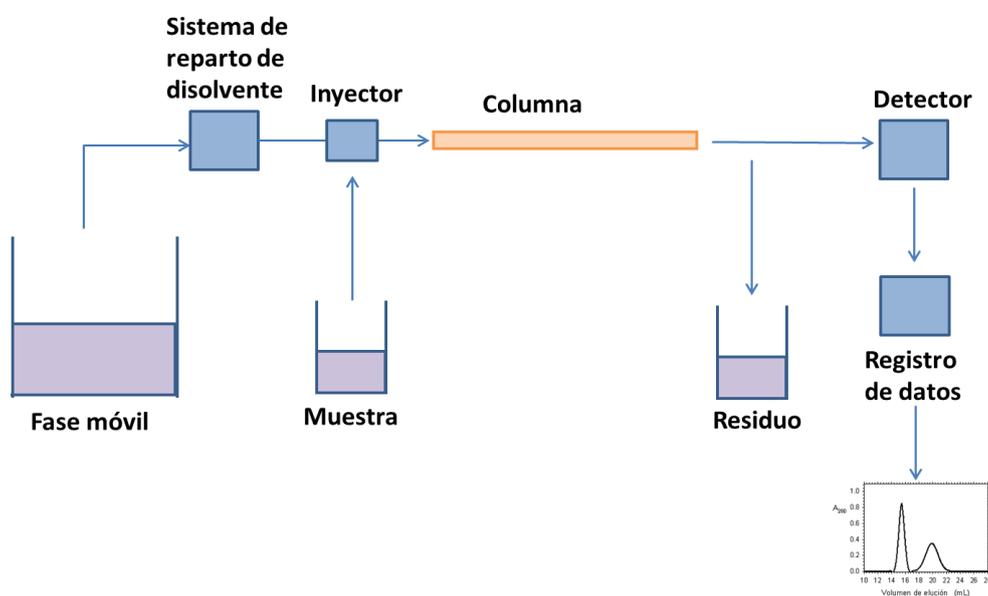


Figura 1-3 Esquema de un sistema cromatográfico.

La cromatografía líquida (CL) trata las diversas formas de cromatografía en las que la fase móvil es un líquido. La bomba introduce constantemente fase móvil en el sistema. La muestra es introducida en el flujo de la fase móvil y pasa por la columna, la cual separa los analitos de la muestra en función de sus afinidades relativas con la fase móvil y la columna y finalmente estos son detectados y registrados. El método más utilizado para la introducción de muestra en el flujo, consiste en usar válvulas de inyección de bucles de volumen conocido, que se intercalan entre la bomba y la entrada de la columna. La introducción de las muestras es frecuentemente el factor controlante de la reproducibilidad de las medidas y los volúmenes de

muestra a inyectar deben ser pequeños. Por otro lado, la elección de la columna dependerá del mecanismo de retención con el que se trabajará para producir la separación. Los tipos de cromatografía líquida en base a este criterio son (Hernández-Hernández y González-Pérez, 2002):

- **Cromatografía de reparto:** Tiene lugar cuando se utiliza una columna con una fase líquida enlazada. Para inmovilizar el líquido se utiliza un soporte sólido de gran área superficial como puede ser el gel de sílice, celulosa, poliestireno, etc. Las especies se reparten por diferencias de solubilidad. Dependiendo de las polaridades relativas de las fases móvil y estacionaria, se distinguen dos modalidades: fase reversa (RP), cuando la fase estacionaria es apolar y la fase móvil es polar, o bien fase normal (NP), cuando la fase estacionaria es polar y la fase móvil es apolar. En este estudio se ha utilizado este tipo de cromatografía en fase reversa.
- **Cromatografía iónica:** La fase estacionaria es una matriz rígida en cuya superficie se dan grupos funcionales cargados positiva o negativamente y contraiones de carga opuesta. La separación se produce por la competencia que se establece entre los iones de la fase móvil y los iones del analito por los centros activos de la resina.
- **Cromatografía de exclusión molecular:** Como fase estacionaria se utilizan los poros de un sólido microporoso o de un gel. La separación se basa fundamentalmente en la exclusión, tales como diferencias en el tamaño de las moléculas y /o en su forma.
- **Cromatografía de adsorción:** La fase estacionaria es un sólido adsorbente con una gran área superficial (alúmina o gel de sílice, por ejemplo). Los centros activos situados sobre la superficie del sólido interactúan con los grupos funcionales de los analitos que se desea separar. Esta separación se produce como consecuencia de la distinta intensidad de estas interacciones entre la columna y los analitos. En este tipo de cromatografía un parámetro importante es el tamaño de partícula del adsorbente, así como las polaridades de las dos fases.

### 1.5.1. Detectores.

Los detectores usados en CL obtienen su señal basándose en una propiedad del soluto que llega después de haber atravesado la columna o basándose en una propiedad de la disolución. Los primeros son bastante selectivos y muy sensibles. (Hernández-Hernández y González-Pérez, 2002). Entre los que se basan en una propiedad del soluto se encuentran los detectores

de absorbancia ultravioleta. Este tipo de detector ha sido usado acoplado al cromatógrafo en el presente proyecto para la determinación de ácidos orgánicos en las muestras. Su fundamento es la espectrofotometría de absorción. También se encuentran detectores de fluorescencia que son especialmente sensibles, si bien están limitados a una pequeña gama de analitos con propiedades fluorescentes. En el detector amperométrico se aplica un determinado potencial al electrodo de trabajo y se mide la intensidad de la corriente resultante de la reacción electroquímica que ocurre. En este proyecto se ha utilizado este tipo de detector para la cuantificación de azúcares en los zumos y néctares. Debido a que los azúcares no contienen grupos cromóforos, la detección de los mismos mediante la espectrometría de UV-Vis acoplada a un cromatógrafo de intercambio iónico solamente es posible cuando se combina con una derivatización de la muestra y esta derivatización suele ser compleja. Por otra parte, existen los detectores que se basan en los cambios de las propiedades de la disolución. Los detectores de índice de refracción es el que más se puede acercar a un detector universal ya que el índice de refracción de la fase móvil deberá modificarse por la presencia de cualquier soluto, aunque el principal inconveniente es son muy sensibles a los cambios de temperatura. Éste es el que se suele utilizar para la detección de azúcares, pero es muy poco sensible. Por último, los detectores de conductividad son los más comúnmente utilizados cuando los analitos eluidos son iónicos después de su separación por cromatografía de intercambio iónico. La medida de la conductividad de líquidos se lleva a cabo aplicando un potencial eléctrico entre dos electrodos. La resistencia (o la conductividad) de la disolución contenida entre los dos electrodos depende de la concentración y de las especies iónicas presentes; sin embargo, solamente se utiliza este detector para especies que conducen la corriente eléctrica.

## 1.6. Espectroscopia Infrarroja

La espectroscopia estudia la interacción de la radiación electromagnética con la materia. La región IR (infrarrojo) del espectro electromagnético se extiende entre el final de la zona del visible y el inicio de la región de las microondas. La región IR es extensa y se divide habitualmente en tres zonas. De las 3 zonas, la región que proporciona mayor cantidad de información estructural es la que se extiende entre los 4000 y los 650  $\text{cm}^{-1}$ . Esta región es la denominada IR media (MIR). Cuando se analiza una muestra con esta técnica, la radiación electromagnética atraviesa la misma, y mediante fenómenos de absorción, reflexión o

emisión, se obtiene su correspondiente espectro, que abarca unas longitudes de onda determinadas. Aunque el espectro IR medio es diferente para cada compuesto, ciertas agrupaciones de átomos dan lugar siempre a bandas características en determinados intervalos de frecuencias, que son relativamente independientes de la naturaleza del resto de la molécula. Estas bandas corresponden a grupos funcionales determinados que permiten una gran utilización de esta tecnología para la determinación estructural. El uso más generalizado de la espectroscopia MIR es el análisis cualitativo. Sin embargo, también, se puede aplicar con fines cuantitativos debido a que el flujo de un haz de luz paralelo se reduce al pasar por una suspensión de partículas. La transmisión de la luz a través de una capa de partículas decrece exponencialmente con la distancia y la concentración. Esta reducción es explicada por la Ley de Lambert-Beer, y puede ser utilizada para la cuantificación de compuestos (Horvath, 1998).

### 1.6.1. Espectrofotómetro FTIR y aplicaciones.

Los espectrofotómetros MIR se pueden clasificar en base a la técnica de medida utilizada. Existen los llamados dispersivos y los FTIR. Los dispersivos fueron los primeros en desarrollarse y realizan un barrido de frecuencias para la obtención del espectro. Los espectrofotómetros FTIR, basados en un barrido interferométrico, someten a la muestra a irradiación IR policromática. Además, los espectrofotómetros FTIR suministran la información en forma digitalizada, y presentan otras ventajas como rapidez, sensibilidad, resolución y relación señal/ruido alcanzable (Hernández-Hernández y González-Pérez, 2002). Se denomina *Fourier Transformed Infrared Spectroscopy* porque necesita de un proceso matemático denominado Transformada de Fourier para convertir los datos brutos en el espectro. Además, existen espectrofotómetros FTIR en los que se llevan a cabo distintos tipos de reflexión sobre la muestra introducida; así, la reflexión de la radiación puede ser especular, difusa o interna. Una variante de la reflexión interna es la Reflectancia Total Atenuada o ATR (*Attenuated Total Reflection*), que es la utilizada en este proyecto.

Muchos estudios se han centrado en la tecnología MIR respecto a la del Infrarrojo cercano (NIR) debido a la poca exactitud de los resultados y porque el MIR podría ofrecer una determinación más precisa de propiedades y constituyentes de la materia (Bauer *et al.* 2008). Recientemente ha crecido el interés del aprovechamiento de esta técnica para determinaciones rápidas de compuestos de frutos y de productos derivados de fruta con el fin último de detectar adulteraciones. Para llegar a conclusiones de este tipo es necesario

correlacionar satisfactoriamente datos fiables obtenidos por métodos destructivos convencionales. Por ejemplo, varios estudios han aplicado la espectroscopia FTIR para el análisis cualitativo y cuantitativo de vinos y mostos con el objetivo de determinar parámetros como alcohol, densidad relativa, refracción, conductividad, glicerol, fenoles totales, azúcares reductores, glucosa, fructosa, sacarosa, valor de pH y ácidos orgánicos. (Patz *et al.*, 2004; Bauer *et al.*, 2008). Otras aplicaciones en zumo de uva han permitido detectar un determinado tipo de uva en mezclas de zumos de diferentes variedades (Synder *et al.*, 2014). Se ha comprobado su eficacia para evaluar la calidad de zumos y mermeladas de diversos tipos de fruta, incluso determinando la adulteración intencionada de los mismos, como el reemplazo de unos ingredientes por otros o la adición de colorantes (Gamal *et al.*, 2011). También se ha aplicado para la predicción de la madurez de mangos evaluando la composición de su zumo (Duarte *et al.*, 2002). Los datos obtenidos por métodos destructivos con los que se correlacionan los datos obtenidos en el FTIR son muy diversos. Distintos autores han correlacionados los datos con métodos enzimáticos (Duarte *et al.*, 2002), colorimétricos (Gamal *et al.*, 2011), cromatográficos (como es el caso de este estudio) o simplemente con datos conocidos de adulteración intencionada (Synder *et al.*, 2014).

Otras aplicaciones de la FTIR en el campo de la agroalimentación son en aceites vegetales para la determinación de fosfolípidos (Meng *et al.*, 2014), para la autenticación de aceites de oliva vírgenes (Lerma-García *et al.*, 2010), determinación de adulterantes en miel (Gallardo-Velázquez *et al.*, 2009) y control del procesado y calidad del queso (Woodcock *et al.*, 2007), entre otros. Todos estos estudios coinciden en que la aplicación de la tecnología FTIR es más favorable en términos de comodidad, nula generación de residuos, tiempo de análisis, etc. que las técnicas de control habituales y en la mayoría de los casos más económica.

### **1.7. Análisis estadístico multivariante.**

El análisis estadístico incluye una serie de técnicas y métodos multivariantes que permiten estudiar y tratar en bloque varias variables medidas u observadas en una colección de individuos. Estas variables pueden ser cualitativas o cuantitativas o simultáneamente de ambos tipos. En modelos de predicción múltiple la variable independiente  $x$  es siempre la predictora (una señal instrumental o una combinación de señales instrumentales) y la variable dependiente o variable respuesta (por ejemplo, una concentración) es la  $y$  (Ramis-Ramos y García-Álvarez-Coque, 2001). Por lo tanto, la matriz de datos que se construye para este tipo

análisis estadístico se divide en dos bloques: el bloque X, con tantas variables como las que se usan como predictoras y que normalmente corresponde a distintos valores de la variable de barrido instrumental, y el bloque Y, con tantas variables respuestas como se dispongan; en el caso de este estudio, solamente se dispone de una por análisis estadístico realizado.

### 1.7.1. Análisis Discriminante lineal.

El Análisis Discriminante Lineal (ADL) o LDA por sus siglas en inglés, es un tipo de análisis estadístico clasificatorio. Con esta herramienta es posible construir modelos que pronostican la pertenencia de un objeto a una categoría en base a sus características y peculiaridades (Miller y Miller, 2004). Es necesario disponer en la matriz de datos de al menos una variable categórica o respuesta, y que indica a que categoría pertenece cada objeto. También son necesarias una o más variables de escala que serán las variables predictoras y que describen las características de los objetos que conforman la matriz. El análisis discriminante lineal trabaja con algoritmos que buscan funciones o vectores discriminantes, es decir, combinaciones lineales de las variables predictoras que maximizan las varianzas entre las categorías previamente establecidas, a la vez que minimizan la varianza intra-categoría. A partir de  $n$  categorías se obtienen  $n-1$  funciones discriminantes. Una vez realizado el análisis se obtienen los coeficientes de las funciones discriminantes que permiten discernir entre categorías, es decir, el LDA estima los coeficientes  $c_1, c_2, c_3, \dots, c_m$  de la función  $f_n$  que tiene en cuenta las variables predictoras  $x_1, x_2, x_3, \dots, x_n$  introducidas en el modelo.

$$f_n = c_1x_1 + c_2x_2 + c_3x_3 + \dots + c_mx_m$$

Las funciones discriminantes se construyen minimizando el valor de Lambda de Wilks ( $\lambda_w$ ), que es calculada como la suma de los cuadrados de las distancias entre puntos que pertenecen a la misma categoría dividido entre la suma total de cuadrados, siendo su valor comprendido entre 0 y 1.

$$\lambda_w = \frac{1}{1 + \lambda'} = \frac{SC_I}{SC_I + SC_D}$$

Donde  $SC_I$  es la suma de cuadrados de las distancias entre objetos que pertenecen a la misma categoría y  $SC_D$ , la suma de cuadrados de las distancias de objetos que pertenecen a distintas

categorías. Valores de  $\lambda_w$  cercanos a 0 son obtenidos con categorías bien resueltas mientras que valores de  $\lambda_w$  próximos a uno indican categorías solapadas (Vandeginste *et al.*, 1998).

Para la construcción del modelo se utiliza un conjunto de datos llamado conjunto de entrenamiento. Una vez obtenidas las funciones discriminantes del modelo, la capacidad de predicción del mismo se evalúa mediante el empleo de un nuevo conjunto de objetos, llamado conjunto de evaluación, que no han sido utilizados previamente en la construcción del modelo, y de los cuales sabemos previamente la categoría. Así determinamos el poder de clasificación real de éste.

### 1.7.2. Regresión Lineal Múltiple.

Con la Regresión Lineal Múltiple (RLM) o MLR por sus siglas en inglés, se obtienen modelos basados en la regresión lineal, que son capaces de predecir una variable respuesta  $y$ , dependiente de una serie de variables predictoras independientes  $x_1, x_2, x_3, \dots, x_n$ . De forma similar a como ocurriría en una regresión lineal simple, consideramos que los valores de  $y$  de cada uno de los objetos, han sido generados por una combinación lineal de una o más variables independientes  $x$ , siguiendo el modelo (Miller y Miller, 2004):

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + \dots + b_nx_n$$

Se observa que cada variable está multiplicada por su pendiente o coeficiente de regresión parcial  $b_j$ . Dichos coeficientes son elegidos por el algoritmo de forma que la suma entre los valores observados y los pronosticados sea la mínima, minimizando la varianza residual. Por otra parte, la linealidad de estas relaciones entre las variables es siempre un supuesto implícito en este tipo de análisis. Una vez obtenido el modelo, se representa el gráfico de valores predichos frente a los valores medidos (observados), donde se observa la linealidad del modelo. De esta forma se puede utilizar el valor de  $R^2$  para comparar diferentes modelos o averiguar si uno en concreto es suficientemente satisfactorio. Además, existe la opción de omitir alguna de las variables predictoras, y es interesante encontrar aquel modelo que prediga adecuadamente los valores de  $y$  con un número mínimo de variables predictoras  $x$ .

Como anteriormente, el modelo en MLR no se construye introduciendo todos los datos, si no con el llamado conjunto de calibración o de entrenamiento. Se deja así un grupo de los mismos fuera, el llamado conjunto de evaluación, con el que se contrastará si realmente el modelo es capaz de predecir aceptablemente los valores de objetos conocidos previamente.

## **2. OBJETIVOS.**

### **2.1. Objetivo general.**

El objetivo general del trabajo es identificar y cuantificar el contenido en azúcares simples y ácidos orgánicos en zumos y néctares de frutas mediante espectroscopia FTIR tomando como referencia los valores obtenidos mediante cromatografía líquida.

### **2.2. Objetivos específicos.**

Para lograr el objetivo general se plantearon distintos objetivos específicos durante la realización de este trabajo:

- Cuantificar los parámetros característicos incluidos en la legislación (azúcares y ácidos orgánicos) mediante cromatografía líquida de distintos tipos de las muestras de zumo y néctar.
- Optimizar los métodos cromatográficos.
- Medida de los espectros de las muestras mediante un espectrofotómetro FTIR.
- Encontrar la herramienta estadística apropiada para la correlación de los datos obtenidos por cromatografía y los espectros.

### **2.3. Plan de trabajo.**

Para la consecución de los objetivos se llevó a cabo una planificación del trabajo con tareas específicas:

- Conseguir muestras diversas y significativas de zumos y néctares de fruta habituales en el mercado.
- Revisión bibliográfica de los métodos cromatográficos previamente empleados en bibliografía, y reoptimización de las condiciones de separación si es necesario.
- Cuantificación de los azúcares y ácidos orgánicos en las muestras.
- Obtención de los espectros de infrarrojo de las muestras mediante un espectrofotómetro FTIR.
- Realizar un análisis estadístico multivariante con MLR, para predecir concentraciones de los parámetros cuantificados mediante los espectros obtenidos.
- Realizar un análisis estadístico multivariante con LDA, para predecir una clasificación de las muestras según el tipo de fruta.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS.

#### 3.1. Reactivos, estándares y disoluciones.

Se emplearon los siguientes reactivos: hidróxido de sodio (NaOH) (Labkem, Barcelona, España), dihidrógenofosfato de potasio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) (Sharlab S.L., Sentmenat, España) y ácido ortofosfórico al 85% (Monplet & Esteban, Barcelona, España). Todas las disoluciones se prepararon en agua desionizada (desionizador Aquinity, Membrapure GmbH, Berlín, Alemania). Se usaron los siguientes estándares de azúcares y ácidos orgánicos: glucosa, fructosa y sacarosa (Sigma-Aldrich, St. Louis, Misuri, EUA), y ácido oxálico, ácido fumárico, ácido isocítrico, ácido málico, ácido ascórbico, ácido láctico, ácido tartárico y ácido cítrico (Sigma-Aldrich, St. Louis, Misuri, EUA). Las disoluciones patrón individuales de azúcares se prepararon a una concentración de  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ , mientras que para los ácidos orgánicos la concentración fue de  $10000 \mu\text{g mL}^{-1}$ , con excepción del ácido isocítrico y fumárico, que se prepararon a  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$  y a  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente. Todas las disoluciones patrón se almacenaron en viales color topacio a  $-20^\circ\text{C}$ . Las disoluciones de trabajo se prepararon diariamente mediante dilución de la correspondiente disolución estándar concentrada.

#### 3.2. Muestras.

Se analizaron un total de 38 zumos y néctares de fruta adquiridos en supermercados de los alrededores (ver Tablas 3-1 y 3-2). Para el análisis por cromatografía todas las muestras, previamente refrigeradas a  $4^\circ\text{C}$ , se centrifugaron a 10.000 rpm y  $20^\circ\text{C}$  durante 10 min. El sobrenadante obtenido se diluyó cuando fue necesario con agua desionizada y se pasó a través de un filtro de nylon de  $0,45 \mu\text{m}$  (Albet, Barcelona, España). Todas las muestras se analizaron por duplicado.

En el caso de análisis por espectroscopia FTIR, se trabajó con la muestra de zumo o néctar sin diluir y atemperada previamente a la medida a  $20^\circ\text{C}$ .

**Tabla 3-1. Tabla de muestras de zumos y néctares de naranja y manzana utilizados en este estudio indicando la composición de los mismos y su código.**

<b>Contenido</b>	<b>Código</b>	<b>Contenido</b>	<b>Código</b>
<b>Naranja</b>		<b>Manzana</b>	
Zumo 100% exprimido	N1	Zumo 100%	M1
Zumo 100% exprimido	N2	Zumo 100% exprimido	M2
Zumo 100% exprimido	N3	Zumo 100% exprimido + ácido ascórbico	M3
Zumo 100% exprimido	N4	Zumo 100% exprimido	M4
Zumo 100% exprimido	N5	Zumo 100% de concentrado	M5
Néctar 55% de zumo + azúcar+ vitamina C	N6	Zumo 100% de concentrado	M6
Néctar 55% de zumo + azúcar+ glucosa+ fructosa+ ácido cítrico + ácido ascórbico	N7	Zumo 100% de concentrado	M7
Néctar 50% de zumo + ácido cítrico + ácido ascórbico+ edulcorantes	N8	Néctar 50% de zumo + ácido cítrico+ azúcar+ fructosa+ glucosa	M8
Zumo 100%	N9	Néctar 50% de zumo + ácido cítrico+ ácido ascórbico+ edulcorantes	M9
Néctar 50% de zumo + ácido cítrico + ácido ascórbico+ azúcares	N10		
Zumo 100%	N11		

**Tabla 3-2. Tabla de muestras de zumos y néctares de piña y uva utilizados en este estudio indicando la composición de los mismos y su código.**

<b>Contenido</b>	<b>Código</b>	<b>Contenido</b>	<b>Código</b>
<b>Piña</b>		<b>Uva</b>	
Zumo 100%	P1	Zumo 100% exprimido	U1
Zumo 100% exprimido	P2	Zumo 100% exprimido	U2
Zumo 100% exprimido	P3	Zumo 100% de concentrado	U3
Zumo 100% exprimido	P4	Zumo 100%	U4
Zumo 100% exprimido	P5	Zumo 100%	U5
Néctar 50% de zumo + ácido cítrico + ácido ascórbico+ edulcorantes	P6	Zumo 100% de concentrado + ácido cítrico	U6
Néctar 50% de zumo + ácido cítrico + edulcorantes	P7	Zumo 100% de concentrado + ácido cítrico	U7
Néctar 51% de zumo + ácido cítrico + ácido ascórbico+ azúcar	P8	Zumo 100% de concentrado + ácido cítrico	U8
Néctar 50% de zumo + ácido cítrico+ ácido ascórbico + azúcar+ fruc.+ gluc.	P9		
Néctar 50% de zumo + ácido cítrico+ azúcar+ Vitamina C	P10		

### **3.3. Instrumentación y condiciones de separación.**

Para la preparación de las distintas disoluciones y para el tratamiento de las muestras se empleó una balanza analítica modelo AB204-S (Mettler Toledo, Greifensee, Suiza), un agitador magnético modelo FB15001 (Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA), una centrífuga modelo 5804R (Eppendorf, Hamburgo, Alemania), un baño de ultrasonidos USC300T (VWK, Lovaina, Bélgica) y un pH-metro modelo Basic20+ (Crison-Hach Lange Spain, Barcelona, España) para la medida del pH. Para la conservación de reactivos y muestras, se utilizó un congelador 7082 300-03 (Liebherr, Bulle, Suiza).

Para la determinación de azúcares se empleó un cromatógrafo de intercambio iónico Compact IC 761 (Metrohm Ltd., Herisau, Suiza) equipado con un detector de pulsos amperométricos HPAEC-PAD 817 Bioscan (Metrohm Ltd, Herisau, Suiza). Para la separación se utilizó una columna Metrosep CARB1 (Metrohm Ltd, Herisau, Suiza) y una fase móvil compuesta por NaOH 100 mM. La elución se llevó a cabo de modo isocrático con un caudal de  $1 \text{ mL min}^{-1}$  y una temperatura de  $25^\circ\text{C}$ . El volumen de inyección empleado fue de  $20\mu\text{L}$ . Para la adquisición de datos se empleó el software IC Net v.1.1 (Metrohm Ltd, Herisau, Suiza).

Para la determinación de ácidos orgánicos, se empleó un cromatógrafo de líquidos Hitachi LaChrom Elite (Hitachi Ltd., Tokio, Japón), dotado de una bomba cuaternaria modelo L-2130, un compartimento termostatzado de columnas modelo L-2300, y un detector UV-vis (modelo L-2420). La separación se llevó a cabo con una columna Synergi 4u Hydro-RP 80A (250 x 4,6 mm) de Phenomenex (Madrid, España). La fase móvil empleada fue agua conteniendo 25 mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ajustada a pH 2,4 con ácido ortofosfórico al 85%. La elución se llevó a cabo en modo isocrático con un caudal de  $1 \text{ mL min}^{-1}$  y una temperatura de  $15^\circ\text{C}$ . El volumen de inyección fue en todos los casos de  $20 \mu\text{L}$ . La detección se llevó a cabo a 210 nm. Para la adquisición de datos se utilizó el software EZChrom (v. 3.3.2. SP1, Agilent Technologies, Santa Clara, California, EUA).

Para el análisis por espectroscopia FTIR de los zumos y néctares de fruta, se utilizó un espectrofotómetro FTIR Tensor 27<sup>TM</sup> (Bruker Optics, Milán, Italia), dotado de un interferómetro Rocksolid<sup>TM</sup>, y de un sistema de detección DigiTect<sup>TM</sup> acoplado a un accesorio ATR (Specac Inc., Woodstock, Georgia, USA), que incluye un cristal de reflexión de ZnSe.

Las medidas de la absorbancia se realizaron a temperatura ambiente con una resolución de  $4 \text{ cm}^{-1}$  y un promedio de 30 barridos, registrándose los espectros desde  $4000$  a  $400 \text{ cm}^{-1}$ . Para cada muestra, se depositan uniformemente 3-4 gotas del zumo o néctar a lo largo de toda la superficie del cristal del ATR, midiéndose la absorbancia respecto a un blanco obtenido a partir de la celda con agua. Entre una muestra y la siguiente, el cristal del ATR se limpió con un pañuelo de celulosa, luego se limpió con acetona y posteriormente se secó. El análisis de los datos se llevó a cabo usando el software OPUS r. 11.0 (Bruker Optics, Milán, Italia).

### **3.4. Tratamiento estadístico de los datos.**

Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el programa SPSS (v. 20.0, Statistical Package for the Social Sciences, Chicago, Illinois, EUA).

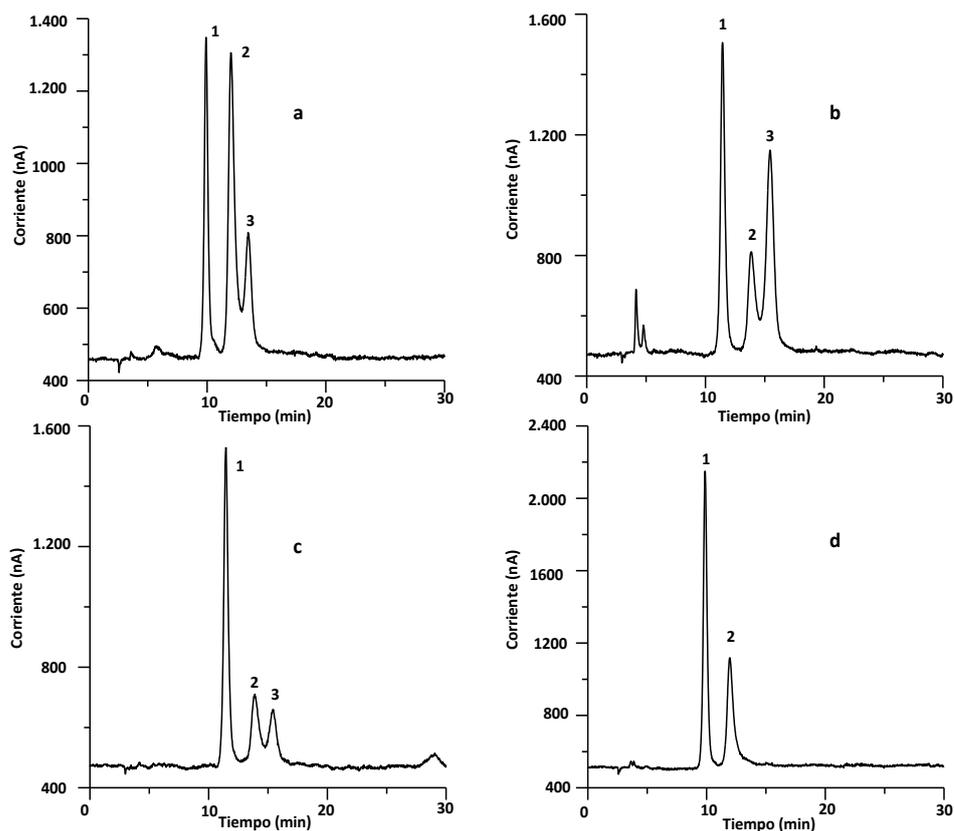
## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

### 4.1. Determinación de azúcares en zumos y néctares de fruta mediante cromatografía iónica.

Las condiciones cromatográficas empleadas para la determinación de azúcares en las muestras de zumos y néctares de fruta considerados en este estudio fueron las siguientes: volumen de inyección, 20  $\mu\text{L}$ ; temperatura de la columna, 25  $^{\circ}\text{C}$ ; caudal 1  $\text{mL min}^{-1}$ . Como fase móvil se utilizó una disolución de NaOH 100 mM en elución isocrática. Previa a su inyección en el cromatógrafo, todas las muestras se diluyeron 1:1000 (v/v) con agua desionizada, excepto los zumos de uva y los néctares, que se diluyeron 1:2000 (v/v) debido a su mayor contenido en azúcares. Los cromatogramas obtenidos para una muestra representativa de cada tipo de zumo (manzana, naranja, piña y uva) se muestran en la Figura 4-1. Tal y como se observa en esta figura, se identificaron un total de 3 carbohidratos en las muestras (mediante la inyección de patrones del correspondiente azúcar): los monosacáridos glucosa y fructosa, y el disacárido sacarosa, excepto en las muestras de uva, donde sólo se encuentran naturalmente glucosa y fructosa.

Posteriormente, se procedió a la cuantificación del contenido de azúcares presente en todas las muestras consideradas en este estudio. Para ello, se prepararon curvas de calibración externa mediante la inyección de cinco disoluciones estándar de cada analito en intervalos de concentración comprendidos entre 5 y 80  $\text{g L}^{-1}$ . Para los tres azúcares, se obtuvieron líneas rectas con  $r > 0,999$ .

Además, se prepararon curvas de calibrado mediante el método de las adiciones de estándar. Para ello, sobre las muestras diluidas, se adicionaron cuatro disoluciones con concentraciones crecientes de los estándares desde la concentración más baja hasta el límite superior del intervalo empleado (80  $\text{g L}^{-1}$ ). Las curvas fueron lineales con  $r > 0,999$ ; y en todos los casos, las pendientes de estas curvas de calibrado no difirieron significativamente de las pendientes obtenidas mediante calibración externa. A partir de estos resultados, se puede afirmar que no existe efecto matriz en la determinación de estos analitos en los zumos y néctares analizados. Por lo tanto, se emplearon las curvas de calibración externa para la cuantificación de los analitos en todas las muestras.



**Figura 4-1. Cromatogramas obtenidos para una muestra de (a) manzana (b) naranja (c) piña y (d) uva donde se muestran los perfiles de azúcares obtenidos. Condiciones experimentales: fase móvil, NaOH 100 mM; caudal 1 mL min<sup>-1</sup>, temperatura 25 °C; volumen de inyección 20 µL. Identificación de los picos: (1) glucosa (2) fructosa (3) sacarosa.**

El contenido de azúcares obtenido para cada tipo de zumo y néctar (expresado como el valor máximo y mínimo para cada uno de ellos en g L<sup>-1</sup>) se muestra en la Tabla 4-1. Todos los valores de azúcares obtenidos para los zumos de fruta cumplieron en todos los casos con los niveles establecidos por la normativa AIJN (AIJN, 2010). Para el zumo de manzana, el azúcar más abundante fue la fructosa, encontrándose sus contenidos entre 56 y 69 g L<sup>-1</sup>, siendo su valor normalmente de 2 a 3 veces mayor que el de glucosa (Muntean, 2010; AIJN, 2010). Por otro lado, la sacarosa fue el azúcar más abundante para los zumos de naranja y piña (38-49 y 39-69 g L<sup>-1</sup>, respectivamente). En los zumos de uva, característicos por no poseer sacarosa, el azúcar más abundante fue la fructosa (80-98 g L<sup>-1</sup>).

**Tabla 4-1. Contenido en azúcares de las muestras de zumo y néctar analizadas en este estudio.**

	<b>Muestra</b>	<b>Glucosa (g L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Fructosa (g L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Sacarosa (g L<sup>-1</sup>)</b>
Zumo	Manzana	20,45-35,56	55,67-68,58	15,81-24,92
	Naranja	22,64-31,81	20,40-31,81	37,52-48,84
	Piña	15,58-38,98	19,25-37,41	39,20-69,25
	Uva	65,91-91,32	80,35-98,09	-
Néctar	Manzana	12,62-23,57	25,69-27,61	5,33-11,96
	Naranja	10,22-48,68	11,97-36,49	14,91-66,31
	Piña	15,64-48,78	15,14-40,07	21,82-93,57

Con respecto a los néctares, en la mayoría de los casos los valores de fructosa y glucosa encontrados fueron menores que los obtenidos para los zumos del mismo tipo de fruta, lo cual puede ser atribuido a una adición de agua al “concentrado de fruta”, tal y como viene reflejado en las propias etiquetas de los néctares. Sin embargo, en algunos casos, como los néctares de naranja y piña N6, N7, N10, P9 y P10, los valores encontrados fueron mayores de lo esperado, lo cual concuerda con las etiquetas de los mismos, donde se declaró una adición de azúcares.

#### **4.2. Determinación de ácidos orgánicos en zumos y néctares de fruta mediante HPLC de fase reversa.**

En primer lugar, se procedió a la optimización de las condiciones de separación de los ácidos orgánicos. Para ello, se seleccionaron un total de 8 patrones de ácidos orgánicos (ácido oxálico, ácido tartárico, ácido málico, ácido isocítrico, ácido ascórbico, ácido acético, ácido cítrico y ácido fumárico), realizándose una mezcla de los mismos. Las concentraciones de los diferentes ácidos en la mezcla se seleccionaron teniendo en cuenta la diferente absorptividad molar de los mismos. Por ello, el ácido fumárico se preparó a una concentración de 10 mg L<sup>-1</sup>, los ácidos oxálico y ascórbico a 100 mg L<sup>-1</sup>, y el resto de ácidos a 500 mg L<sup>-1</sup>. Las condiciones iniciales que se testaron fueron adaptadas de la bibliografía (Reuter, 2015). Se probó una fase móvil compuesta por KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 25 mM a pH 2,4 (en elución isocrática), un caudal de 1 mL min<sup>-1</sup>, temperatura de 30 °C y volumen de inyección de 20 µL. Bajo estas condiciones (ver

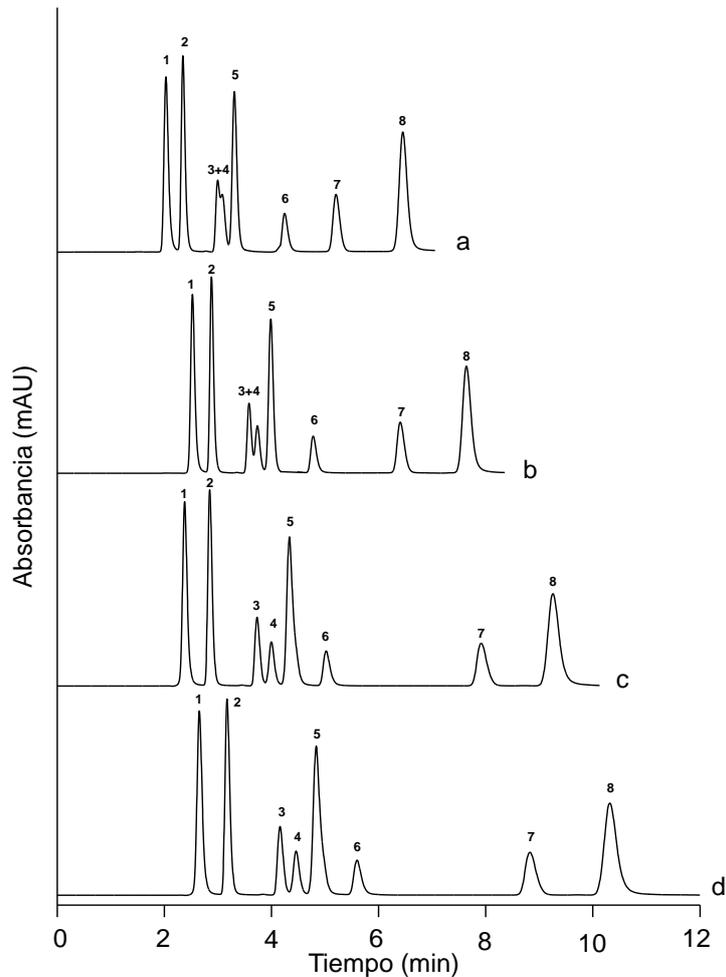
Figura 4-2, parte b), se observó una coelución parcial de los picos correspondientes a los ácidos málico y isocítrico. Por ello, con el fin de aumentar la resolución de este par de picos, se decidió estudiar la influencia de la temperatura en la separación de los ácidos, variándose la

misma entre 15 y 40 °C. Tal y como se observa en la Figura 4-2, a menor temperatura, el tiempo de análisis aumentó; sin embargo, la mejor resolución de todos los pares de picos se obtuvo a una temperatura de 15 °C, por lo que seleccionó para estudios posteriores.

Una vez seleccionada la temperatura óptima, se estudió la influencia del caudal en la separación de los ácidos orgánicos, variándose el mismo entre 0,8 y 1,5 mL min<sup>-1</sup>. El tiempo de análisis disminuyó al aumentar el caudal; sin embargo, la resolución de los picos, principalmente el par málico-isocítrico, fue un poco menor a caudales elevados (1,5 mL min<sup>-1</sup>) (datos no mostrados). Cuando el caudal se disminuyó a 0.8 mL min<sup>-1</sup>, se observó un aumento en el tiempo de análisis, aunque no se mejoró la resolución entre los picos. Por ello, se seleccionó un caudal de 1,0 mL min<sup>-1</sup> para los estudios posteriores.

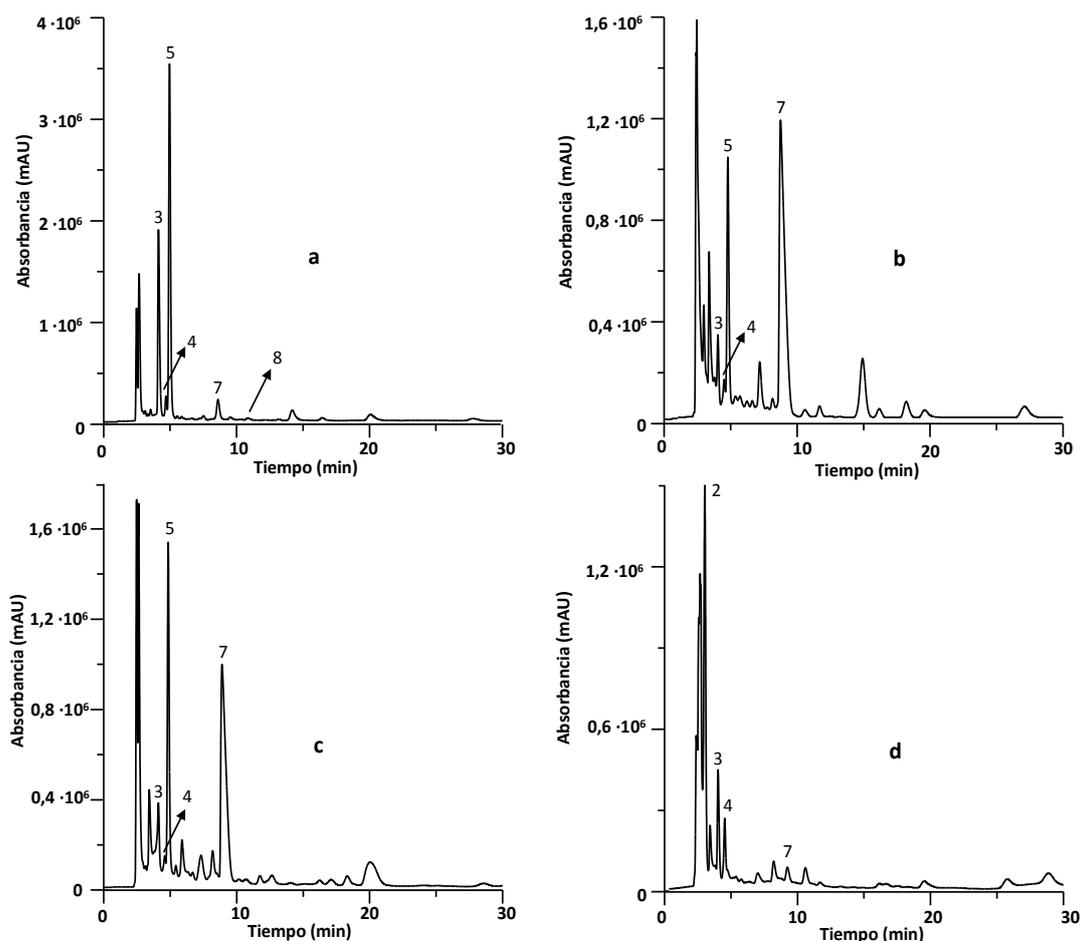
Una vez obtenidas las condiciones óptimas de separación, se procedió a la inyección de todas las muestras de zumos y néctares ensayados. Los cromatogramas obtenidos para una muestra representativa de cada tipo de zumo (manzana, naranja, piña y uva) se muestran en la Figura 4-3. La identificación de los picos de los analitos en las muestras se realizó por comparación de los tiempos de retención encontrados en éstos con los obtenidos inyectando los patrones; y cuando fue necesario también se fortificaron las muestras con los estándares, observándose el aumento correspondiente del pico del analito de interés. De todos los ácidos orgánicos estudiados, en las muestras se identificaron el ácido tartárico, málico, isocítrico, ascórbico, cítrico y fumárico. Tal y como se observa en la Figura 4-3, el ácido tartárico tan sólo se identificó en las muestras de uva, mientras que el fumárico se encontró sólo en las de manzana.

Una vez identificados los picos correspondientes a los diferentes ácidos orgánicos, se procedió a la cuantificación de los mismos, si bien se decidió no cuantificar el ácido ascórbico debido a su fácil oxidación, dando lugar a pérdidas del mismo debido al almacenamiento de las muestras y a la temperatura (Scherer *et al.*, 2012). Para ello, se construyeron curvas de calibración externa mediante la inyección de cinco disoluciones estándar de cada uno de los analitos. Se adoptaron dos intervalos para el ácido cítrico: un intervalo a baja concentración (10-1000 mg L<sup>-1</sup>) que fue utilizado para cuantificar el ácido cítrico en las muestras de manzana y de uva, y un intervalo a alta concentración (2000-15000 mg L<sup>-1</sup>), que se utilizó para las muestras de naranja y piña. En el caso de los ácidos málico, tartárico, fumárico e isocítrico, los intervalos empleados fueron 500-15000 mg L<sup>-1</sup>, 500-5000 mg L<sup>-1</sup>, 0,1 y 10 mg L<sup>-1</sup> y 10-500 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente. En todos los casos, los valores de r obtenidos fueron mayores de 0,998.



**Figura 4-2. Influencia de la temperatura en la separación de ácidos orgánicos utilizando (a) 40 °C, (b) 30 °C (c) 20 °C y (d) 15 °C. Condiciones experimentales: fase móvil,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  25 mM a pH 2,4; caudal,  $1 \text{ mL min}^{-1}$ ; volumen de inyección,  $20 \mu\text{L}$ ; detección, 210 nm. Identificación de los picos: (1) ácido oxálico, (2) ácido tartárico, (3) ácido málico, (4) ácido isocítrico, (5) ácido ascórbico, (6) ácido acético, (7) ácido cítrico y (8) ácido fumárico.**

También en este caso, se prepararon curvas de calibrado mediante el método de las adiciones de estándar, tal y como se especifica en el análisis de azúcares. Las curvas obtenidas fueron lineales con  $r > 0,997$ ; y en todos los casos, las pendientes de estas curvas de calibrado no difirieron significativamente de las pendientes obtenidas mediante calibración externa. A partir de estos resultados, se puede afirmar que no existe efecto matriz en la determinación de estos analitos en las muestras analizadas. Por lo tanto, se emplearon las curvas de calibración externa para la cuantificación de los analitos en todas las muestras.



**Figura 4-3. Cromatogramas obtenidos para una muestra de (a) manzana (b) naranja (c) piña y (d) uva donde se muestran los perfiles de ácidos orgánicos obtenidos. Condiciones experimentales: temperatura, 15 °C. Otras condiciones e identificación de los picos como en la Figura 4-2.**

El contenido de ácidos orgánicos obtenido para cada tipo de zumo y néctar (expresado como el valor máximo y mínimo para cada uno de ellos en  $\text{mg L}^{-1}$ ) se muestra en la Tabla 4-2. Como se aprecia esta tabla, existe cierta variabilidad en las concentraciones de ácidos orgánicos entre los diferentes tipos de zumos y néctares, lo cual concuerda con los estudios descritos en bibliografía (Fügel *et al.*, 2005). El ácido málico fue el ácido más abundante de los zumos de manzana, encontrándose sus contenidos entre  $3300\text{-}11700 \text{ mg L}^{-1}$ , mientras que las concentraciones de ácido cítrico variaron entre  $80\text{-}700 \text{ mg L}^{-1}$ .

En lo que respecta al ácido fumárico, la concentración natural de éste en zumos de manzana no suele exceder de  $5 \text{ mg L}^{-1}$  (AIJN, 2010); de hecho, concentraciones superiores son indicativas de fenómenos de descomposición microbiana (p.e. procesado de frutas deterioradas) (Trifirò *et al.*, 1997; Kvasnicka y Voldrich, 2000) o adición de ácido málico sintético (Kvasnicka y Voldrich, 2000).

En este estudio, los contenidos de ácido fumárico encontrados (0,18 y 2,88 mg L<sup>-1</sup>) satisfacen este límite legal, indicando que estos zumos han sido procesados correctamente.

**Tabla 4-2. Contenido de los principales ácidos orgánicos de las muestras de zumo y néctar analizadas en este estudio.**

	<b>Muestra</b>	<b>Tartárico (mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Málico (mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Isocítrico (mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Cítrico (mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Fumárico (mg L<sup>-1</sup>)</b>
Zumo	Manzana	-	3300-11700	-	80-700	0,18-2,88
	Naranja	-	1050-1800	840-1500	9300-12900	-
	Piña	-	2100-2800	750-1100	6400-7000	-
	Uva	2900-3400	2000-3800	-	460-930	-
	Uva (ác. cítrico añad.)	1300-1500	2000-2100	-	2600-4300	-
Néctar	Manzana	-	3100-3200	-	120-180	0,17-1,17
	Naranja	-	630-900	540-860	5200-8400	-
	Piña	-	1100-1800	250-860	6900-10900	-

Con respecto a los zumos de uva analizados (U1-U5), las concentraciones de ácido tartárico, cítrico y málico halladas se encuentran en el intervalo permitido por la AJIN (AIJN, 2010), excepto para la muestra U2 donde la concentración de ácido cítrico encontrada fue superior a la legislada, quizá debido a una adición de éste ácido en la muestra no declarada en la etiqueta.

Por otro lado, en los zumos de naranja y piña, los valores de ácido málico y cítrico encontrados cumplieron con los límites establecidos por la AIJN (AIJN, 2010); sin embargo, se detectaron en todos los casos valores de ácido isocítrico mucho más elevados de los esperados, lo cual parece indicar una coelución del pico del ácido isocítrico con algún otro pico de la matriz. Con el fin de comprobar esta hipótesis, sería necesario realizar un análisis de estas muestras mediante HPLC acoplado a un detector de espectrometría de masas.

Por otra parte, en ninguna muestra analizada (excepto para zumos de uva) se evidenció la presencia de ácido tartárico, lo que indica que estas muestras no fueron adulteradas con zumos de uva.

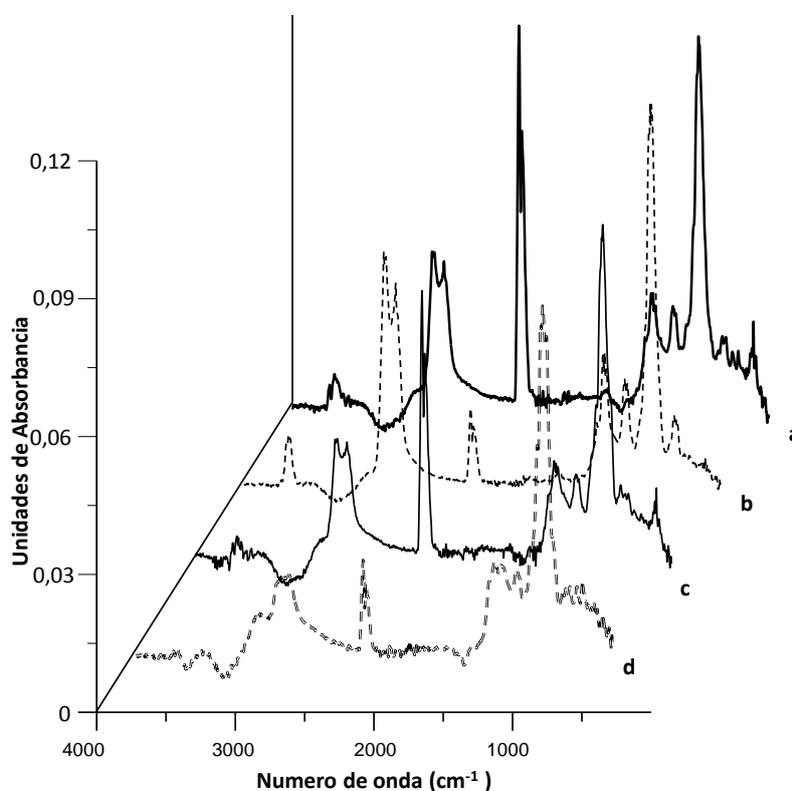
### 4.3. Medida de los espectros FTIR de las muestras de zumo y néctares.

Se utilizó el espectrofotómetro FTIR descrito en la sección de materiales y métodos de la presente memoria. Se realizó un barrido de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ . El equipo disponía de un dispositivo ATR como método de introducción de muestra, con el que se registró la absorbancia de las muestras. Se depositaron unas 3-4 gotas de las muestras sobre el cristal y entre las determinaciones se llevó a cabo una limpieza del mismo. El análisis se realizó dos veces para cada una de las muestras. La elección del número de barridos que realiza el equipo se llevó a cabo llegando a un acuerdo entre precisión y tiempo de análisis y se fijó en 30 barridos. La resolución del equipo fue de 4  $\text{cm}^{-1}$ , este es el ancho de banda en el que registra cada uno de los puntos del espectro. A esta resolución no se encontró ruido en los espectros, sin estar excesivamente suavizados los espectros como para perder información. Dado que los zumos y néctares contienen alrededor de un 90 % de agua, esta influye en el espectro obtenido, enmascarando posible información relevante respecto a la composición en azúcares y ácidos orgánicos de las muestras. Así pues, se realizó una medida de agua como blanco, la cual posteriormente se utilizó para corregir los espectros de las muestras.

En la Figura 4-4 se observan los espectros de absorbancia correspondientes a cuatro muestras de los diferentes tipos de fruta con los que se ha trabajado en este estudio. Las diferencias entre ellos son mínimas a simple vista. Una interpretación de las bandas de absorción proporcionaría información sobre el esqueleto molecular y los grupos funcionales de los compuestos de las muestras. En el caso de este estudio, el espectro FTIR se dividió en 25 regiones susceptibles de contener información, aquellas regiones correspondientes a un pico o a un “hombro”, que se observaba más variable entre distintas muestras al analizar visualmente todos los espectros obtenidos. Las áreas bajo este pico u “hombro” del espectro se determinaron usando el software OPUS r. 11.0 (Bruker Optics, Milán, Italia).

Para reducir la variabilidad debido a factores diferentes a los de la composición de la muestra, como el tamaño total de la muestra de zumo o néctar usada, y para minimizar otros factores que afectan a la intensidad de todos los picos del espectro como el espesor de la muestra o la intensidad de la fuente de radiación, se utilizaron las áreas normalizadas y no las absolutas (Lerma-García *et al.*, 2010). El proceso de normalización se realizó de la siguiente manera: el área de cada una de las regiones fue dividida por cada una de las áreas de las 24 regiones restantes, de forma, además que cada par de variables fueran consideradas solamente una

vez. Se obtuvieron así 300 áreas normalizadas, que serán las variables a considerar para la predicción de concentraciones y clasificación posteriores.



**Figura 4-4. Espectros FTIR para muestras de (a) manzana (b) naranja (c) piña (d) uva.**

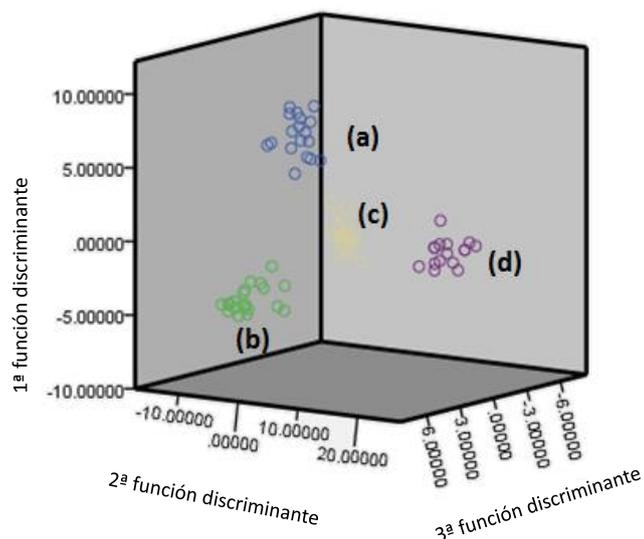
#### **4.4. Clasificación de las muestras según el tipo de fruta mediante análisis discriminante lineal (LDA).**

Para llevar a cabo este análisis fue preciso construir una matriz de datos que incluía una variable categórica, indicando la categoría a la que pertenece cada uno de los objetos, que conformaría la variable respuesta. En el presente estudio, se asignaron las categorías siguientes: 1 para muestras provenientes de manzana, 2 para las de naranja, 3 para las procedentes de piña y 4 para las de uva. Además, esta matriz de datos debía incluir las variables de escala que describían las características de los objetos y que actuaban como variables predictoras, en este caso las 300 áreas normalizadas de los espectros. Los modelos

de LDA se obtuvieron mediante el algoritmo de inclusión por pasos del software SPSS, que seleccionó las variables significativas para la clasificación de los objetos.

Según este método, una variable predictora es incluida en el modelo si la reducción del parámetro de Lambda de Wilks ( $\lambda_w$ ) producida después de su inclusión excede el límite de entrada ( $F_{in}$ ) del test de comparación de varianzas o test F. Sin embargo, lo que ocurre es que la entrada de una nueva variable predictora modifica la significancia de aquellas que ya estaban presentes en el modelo. Es por esta razón por la que existe un límite F de salida ( $F_{out}$ ) que el algoritmo usa para determinar si las variables predictoras que ya estaban en el modelo deben ser eliminadas de él. En este caso, fueron utilizados los valores por defecto de probabilidad de  $F_{in}$  y  $F_{out}$ , 0,05 y 0,10 respectivamente.

Para la construcción del modelo, de los 76 datos disponibles, se utilizaron 54 datos (conjunto de entrenamiento) mientras que aproximadamente el 30% restante, 22 datos no fueron incluidos en el modelo y formaron parte del conjunto de evaluación. Con este conjunto de evaluación fue comprobada la eficacia del modelo para clasificar correctamente muestras de categoría conocida. En este caso, el modelo tuvo un 90% de capacidad de predicción del conjunto de evaluación. En la Figura 4-5 se puede observar el gráfico obtenido a partir de las tres funciones discriminantes del modelo. Se puede observar una clara agrupación de los puntos en el espacio en cuatro grupos. Además, es capaz de distinguir favorablemente entre categorías ya que la Lambda de Wilks ( $\lambda_w = 0,078$ ) obtenida se aproxima a 0.



**Figura 4-5. Gráfico de puntuaciones en un plano oblicuo del espacio tridimensional definido por las tres funciones discriminantes del modelo LDA construido para discriminar entre muestras provenientes de diferentes frutas, para muestras de (a) manzana (b) naranja (c) piña (d) uva.**

El número de variables que el algoritmo incluyó en el modelo son 13. En la Tabla 4-3 se muestran las 13 variables normalizadas elegidas por el modelo así como sus coeficientes estandarizados para cada una de las funciones discriminantes del LDA.

**Tabla 4-3. Variables predictoras seleccionadas del modelo de LDA y sus correspondientes coeficientes estandarizados.**

Variable predictorora	Coeficientes estandarizados			Variable predictorora	Coeficientes estandarizados		
	1ª Función	2ª Función	3ª Función		1ª Función	2ª Función	3ª Función
R1/R2	-0,608	-0,525	1,138	R10/R19	10,189	-14.215	-9.203
R1/R4	0,311	-0,450	0,616	R10/R21	-17.095	11.273	8.113
R3/R24	13.612	5.046	9,594	R11/R16	-17.095	11.273	8.113
R5/R15	2.728	0,343	-0,742	R12/R14	15.871	2.195	-2.005
R6/R20	0.583	-1.303	-0,788	R19/R21	6.902	-0.079	-1.684
R7/R8	-0,508	1.891	5.432	R22/R24	-8.567	-2.628	-8.704
R9/R20	4.019	2.137	-0.731				

#### 4.5. Cuantificación de azúcares en las muestras mediante regresión lineal múltiple (MLR).

Con el objetivo de evaluar la capacidad de los datos obtenidos de los espectros de las muestras para predecir la concentración de azúcares se llevó a cabo un análisis por regresión lineal múltiple. Con dicho análisis se pretendía obtener tres modelos (uno para cada azúcar) que fueran capaces de predecir las concentraciones encontradas; con el fin de evaluar su utilidad para el análisis no destructivo en muestras de concentraciones desconocidas. Para ello se crearon tres matrices de datos similares a las usadas para el LDA. Las variables independientes eran las áreas normalizadas como se ha explicado anteriormente y la variable dependiente o variable repuesta fue la concentración de azúcar correspondiente en cada caso. Para el MLR también se tuvo en cuenta para cada caso un conjunto de calibración y un conjunto de evaluación.

El conjunto de calibración es el total de objetos con el que el algoritmo construye el modelo con el que predice la variable respuesta (representado en la Figura 4-6 en color verde). De

forma similar a lo que ocurre con el LDA, el algoritmo de la regresión lineal múltiple (MLR) seleccionó las variables que aportaron más información al modelo.

En este caso también se seleccionó el método de inclusión por pasos del software SPSS, con los valores por defecto de probabilidad de  $F_{in}$  y  $F_{out}$ , 0,05 y 0,10 como umbrales de entrada y de salida de variables predictoras en el modelo.

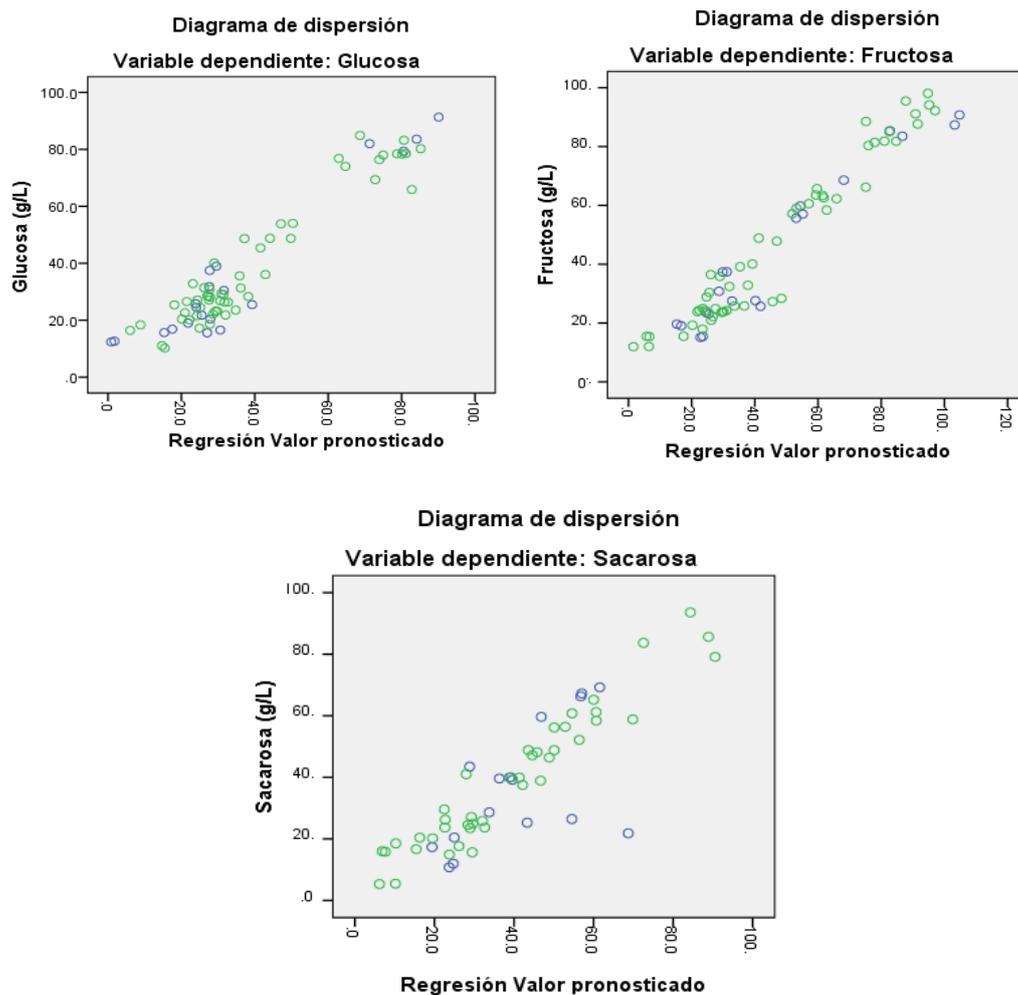
En la Tabla 4-4 se muestran distintos parámetros de la regresión para los modelos de predicción de glucosa, fructosa y sacarosa. Además, se muestran las variables predictoras seleccionadas por el algoritmo. Para la glucosa y la sacarosa se utilizaron los datos de todas las muestras analizadas por duplicado mientras que para la regresión de la sacarosa los datos de zumos de uva no fueron incorporados ya que no se encontró este compuesto en las muestras (como se comentó en el apartado 4.1.).

En la misma tabla, se puede observar el error típico de la estimación, el cual mide la dispersión de los datos alrededor de la recta de regresión estimada. Este error se expresa en las mismas unidades que los datos introducidos y sirve para evaluar si la ecuación de regresión predice correctamente la respuesta. El coeficiente de determinación ( $R^2$ ) indica la proporción del ajuste que se ha conseguido con el modelo lineal. Como se observa en la tabla, se obtuvieron valores de  $R^2$  altos, y bajos valores del error estimado, indicando una buena correlación entre los valores predichos por el modelo y los valores reales introducidos como variable respuesta para los tres azúcares.

**Tabla 4-4. Parámetros de la regresión lineal múltiple (número de objetos en el conjunto de calibración,  $R^2$ , error estimado y variables introducidas) para los modelos de predicción de concentraciones de glucosa, fructosa y sacarosa en los zumos y néctares estudiados.**

<b>Azúcar</b>	<b>Nº objetos Calibración</b>	<b>Nº objetos validación</b>	<b><math>R^2</math></b>	<b>Error típico de la estimación (g L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Variables utilizadas</b>
<b>Glucosa</b>	54	20	0,928	6,385	R3/R8; R10/R16 R13/R19; R18/R22 R10/R15; R8/R21
<b>Fructosa</b>	54	20	0,951	6,276	R19/R21; R8/R11 R2/R11; R6/R15
<b>Sacarosa</b>	42	16	0,953	5,582	R17/R22; R18/R23 R11/R25; R3/R5 R5/R7; R5/R6 R13/R15; R17/R19 R12/R21; R3/R7

En la Figura 4-6, se observan los diagramas de dispersión de los modelos de predicción. En ellos se representan los objetos de los conjuntos de calibración (etiquetados en verde) y los de evaluación (etiquetados en azul). Se observa un buen ajuste a una línea recta, así como se puede percibir que en la mayoría de los casos los objetos del conjunto de evaluación se encuentran cerca de la nube de datos que conforma la línea recta central; lo que indica una buena bondad del ajuste.



**Figura 4-6.** Gráficos de valores predichos por el modelo de MLR versus los valores observados para la glucosa, fructosa y sacarosa. Los objetos en color verde pertenecen al conjunto de calibración mientras que los etiquetados en color azul pertenecen al conjunto de evaluación.

#### 4.6. Cuantificación de ácidos orgánicos en las muestras mediante regresión lineal múltiple (MLR).

De manera análoga al apartado anterior, se realizó un análisis estadístico mediante MLR para conseguir un modelo matemático que relacione las regiones seleccionadas del espectro FTIR con los datos de ácidos orgánicos obtenidos por HPLC. De nuevo se seleccionó el método de inclusión por pasos del software SPSS, con los valores por defecto de probabilidad de  $F_{in}$  y  $F_{out}$ , 0,05 y 0,10 como umbrales de entrada y de salida de variables predictoras en el modelo.

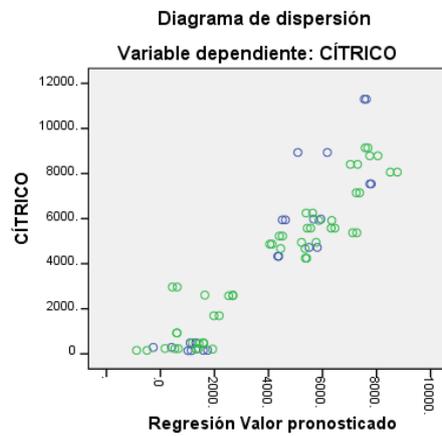
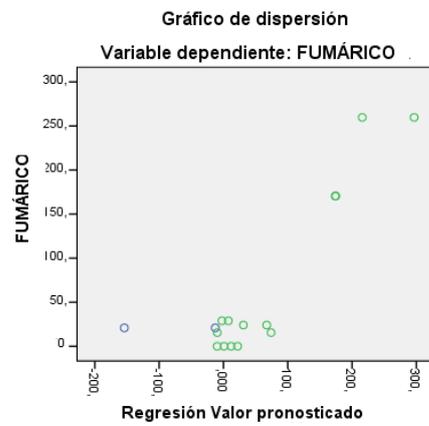
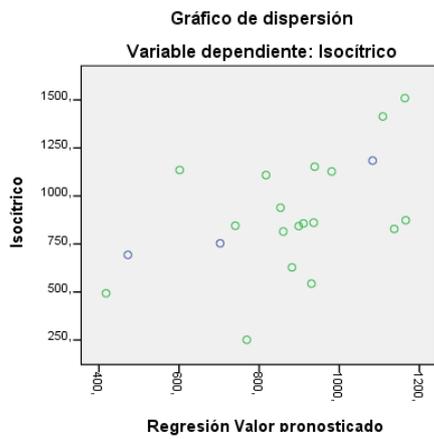
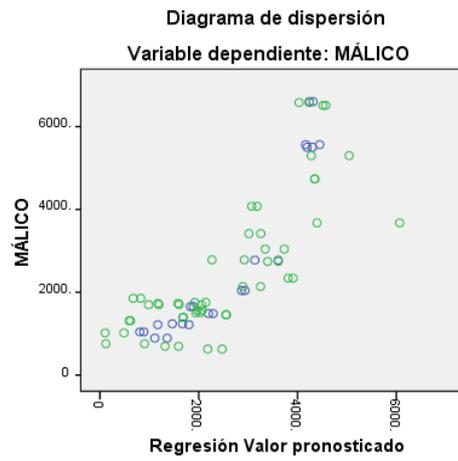
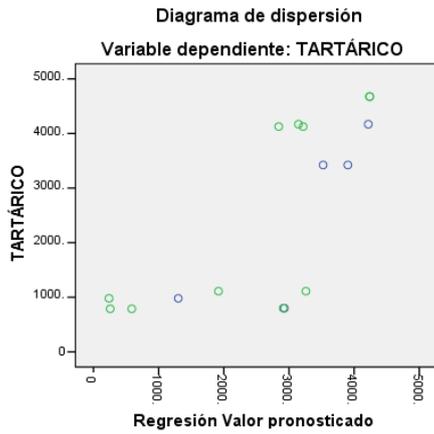
También se utilizó un conjunto de evaluación para la validación de cada uno de los modelos. Un resumen de los parámetros de los modelos obtenidos para cada uno de los ácidos orgánicos contenidos en las muestras se encuentra en la Tabla 4-5.

**Tabla 4-5. Parámetros de la regresión lineal múltiple (número de objetos en el conjunto de calibración,  $R^2$ , error estimado y variables introducidas) para los modelos de predicción de concentraciones de ácido tartárico, málico, isocítrico, cítrico y fumárico, en los zumos y néctares estudiados.**

Ácido orgánico	Nº objetos calibración	Nº objetos Validación	$R^2$	Error típico de la estimación (mg L <sup>-1</sup> )	Variables utilizadas
Tartárico	11	5	0,496	796,419	R5/R8
Málico	52	22	0,686	965,840	R17/R22; R19/R23; R9/R10
Isocítrico	18	4	0,371	255,555	R17/R23
Cítrico	54	22	0,901	945,469	R19/R21; R2/R14; R1/R10; R2/R11
Fumárico	14	2	0,979	0,182	R5/R9; R8/R21; R16/R18; R1/R2; R4/R10

La diferencia entre número de objetos para la calibración entre los diferentes ácidos es debido a que no todos los ácidos se encuentran presentes en todas las muestras.

Los valores de  $R^2$  y de error estimado indican que, en general, no se obtuvo una buena correlación entre los datos del espectro y los valores obtenidos por cromatografía. Esto se confirma en los gráficos de valores predichos por el modelo de MLR versus los valores observados (Figura 4-7). En dicho gráfico se observa que no hay una buena correlación lineal entre los datos predichos por el modelo y los datos reales observados. En general, con estas condiciones no se podría predecir el contenido en ácidos orgánicos de zumos y néctares de fruta a partir de los espectros FTIR.



**Figura 4-7. Gráficos de valores predichos por el modelo de MLR versus los valores observados para la glucosa, fructosa y sacarosa. Los objetos en color verde pertenecen al conjunto de calibración mientras que los etiquetados en color azul pertenecen al conjunto de evaluación.**

## 5. CONCLUSIONES.

Las principales conclusiones obtenidas tras la realización de este estudio son las siguientes:

- La cromatografía es un método fiable para la obtención de resultados de parámetros de interés para evaluar la autenticidad en los zumos y néctares de fruta; sin embargo, requiere mucho tiempo, alta cualificación del personal encargado de los análisis, recursos económicos altos y genera mucha cantidad de residuos. Además, es necesario frecuentemente una optimización del método analítico para cada familia de compuestos.
- Realizando una regresión lineal múltiple (MLR) es posible predecir satisfactoriamente el contenido de los principales azúcares simples en los zumos y néctares de fruta comerciales a partir de los espectros obtenidos con el espectrofotómetro FTIR.
- Realizando una regresión lineal múltiple (MLR) no se puede predecir satisfactoriamente el contenido de los diferentes ácidos orgánicos de los zumos y néctares de frutas comerciales. Serían necesarios nuevos análisis, con un tamaño mayor de muestras para los conjuntos de calibración y evaluación, para evaluar de nuevo el posible uso de la espectroscopia FTIR en la predicción de ácidos en zumos y néctares.
- Realizando un análisis discriminante lineal (LDA) es posible clasificar satisfactoriamente muestras de zumos y néctares comerciales a partir de los espectros obtenidos con un espectrofotómetro FTIR, en función del tipo de fruta.
- En base a los resultados obtenidos en el presente trabajo la espectroscopia FTIR se posiciona como una técnica rápida y sencilla para evaluar la autenticidad de zumos y néctares, y evitar posibles adulteraciones en los mismos.

## 6. REFERENCIAS.

- Ashurst, P.R. (2005). *Chemistry and technology of soft drinks and fruit juices*. 2nd ed; Blackwell Publishing Ltd: Oxford, UK
- Association of the Industry of Juices and Nectars. (2010). Code of Practice for Evaluation of Fruit and Vegetable Juices, AIJN, Brussels. Belgium.
- Astiasarán, I. & Martínez, J.A. (2003). *Alimentos: Composición y propiedades*. 2ª ed. Ed. McGraw-Hill. Capítulo 9.
- Bauer, R.; Nieuwoudt, H.; Bauer, F. F.; Kossmann, J.; Koch, K.R. & Esbensen, K. H. (2008). FTIR spectroscopy for grape and wine analysis. *Analytical Chemistry*, 80, 1371–1379.
- Belitz, H.-D.; Grosch, W. & Schieberle, P. (2011). *Química de los alimentos*. 3ª ed. Ed. Springer-Verlag GmbH. Capítulo 18.
- BOE (2003). Real Decreto 1050/2003, de 1 de agosto, por el que se aprueba la Reglamentación técnico-sanitaria de zumos de frutas y de otros productos similares, destinados a la alimentación humana. *Boletín Oficial del Estado*, 184, de 2 de agosto de 2003, 29970 – 29974.
- BOE (2007). Real Decreto 1518/2007, de 16 de noviembre, por el que se establecen parámetros mínimos de calidad en zumos de frutas y los métodos de análisis aplicables. *Boletín Oficial del Estado*, 294, de 8 de diciembre de 2007, 50632-50639.
- BOE (2011). Real Decreto 462/2011, de 1 de abril, por el que se modifica el Real Decreto 1050/2003, de 1 de agosto, por el que se aprueba la Reglamentación técnico-sanitaria de zumos de frutas y de otros productos similares, destinados a la alimentación humana. *Boletín Oficial del Estado*, 85, de 9 de abril de 2011, 36807-36809.
- Chinnici, F.; Spinabelli, U.; Riponi, C. & Amati, A. (2005). Optimization of the determination of organic acids and sugars in fruit juices by ion-exclusion liquid chromatography. *Journal of Food Composition and Analysis*, 18,121-130.
- Codex Stan 247-2005. Norma General del Codex para Zumos y Néctares de Frutas. [www.codexalimentarius.org](http://www.codexalimentarius.org)
- Cordella, C.; Moussa, I.; Martel, A.C.; Sbirrazzouli, N. & Lizzani-Cuvelier, L. (2002). Recent Developments in Food Characterization and Adulteration Detection: Technique-Oriented Perspectives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 1751–1764.
- Cunha, S.C. & Fernandes, J.O. (2002). HPLC/UV determination of organic acids in fruit juices and nectars. *Eur. Food Res. Technol.*, 214, 67-71.

- Duarte, I.; Barros, A.; Delgadillo, I.; Almeida, C. & Gil, A. (2002). Application of FTIR Spectroscopy for the Quantification of Sugars in Mango Juice as a Function of Ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 3104-3111.
- Ehling, S. & Cole, S. (2011). Analysis of organic acids in fruit juices by liquid chromatography-mass spectrometry: an enhanced tool for authenticity testing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 2229-2234.
- Fügel, R.; Carle, R., & Schieber, A. (2005). Quality and authenticity control of fruit purées, fruit preparations and jams – a review. *Trends Food Sci. Tech.*, 16, 433–441.
- Gallardo-Velázquez, T.; Osorio-Revilla G.; Zuñiga-de Loa, M. & Rivera-Espinoza, Y. (2009). Application of FTIR-HATR spectroscopy and multivariate analysis to the quantification of adulterants in Mexican honeys. *Food Research International*, 42, 313–318.
- Gamal, M.; Mohamed, S.; Safaa, K.; Ahmed, H. & Mohie, K. (2011). Application of FT-IR Spectroscopy for Rapid and Simultaneous Quality Determination of Some Fruit Products. *Nature and Science*, 9 (11).
- Hernández Hernández, L y González Pérez, C. (2002). *Introducción al análisis experimental*. Ariel Ciencia, Barcelona, España.
- Horvath, H. (1988) Experimental investigation on the validity of the Lambert–Beer law at high particle concentrations *J. Aerosol Sci.*, 19, 837–40.
- Jandric, Z.; Roberts, D.; Rathor, M.N.; Abraham, A.; Islam, M. & Cannavan, A. (2014). Assessment of fruit juice authenticity using UPLC–QToF MS: A metabolomics approach. *Food Chemistry*, 148, 7-17.
- Karadeniz, F. & Eksi, A. (2002). Sugar composition of apple juices. *European Food Research and Technology*, 215, 145-148.
- Kelebek, H.; Selli, S.; Canbas, A. & Cabaroglu, T. (2009). HPLC determination of organic acids, sugars, phenolic compositions and antioxidant capacity of orange juice and orange wine made from a Turkish cv. Kozan. *Microchem. J.*, 91, 187–192.
- Kelly, J.F. & Downey, G. (2005). Detection of sugar adulterants in apple juice using Fourier Transform infrared spectroscopy and chemometrics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 3281-3286.
- Kvasnicka, F., & Voldrich, M. (2000). Determination of fumaric acid in apple juice by on-line coupled capillary isotachopheresis–capillary zone electrophoresis with UV detection. *Journal of Chromatography A*, 891, 175–181.

- Lerma-García, M.J.; Ramis-Ramos, G. J.; Herrero-Martínez, M. & Simó-Alfonso, E.F. (2010). Authentication of extra virgin olive oils by Fourier-transform infrared spectroscopy. *Food Chemistry*, 118, 78–83.
- Martínez-Montero, C.; Rodríguez-Dodero, M.C.; Guillén-Sánchez, D.A. & Barroso, G.C. (2004). Analysis of low molecular weight carbohydrates in food and beverages: a review. *Chromatographia*, 59, 15-30.
- Mato, I.; Huidobro J.; Simal-Lozano J. & Sancho M. (2006). Simultaneous determination of organic acids in beverages by capillary zone electrophoresis. *Analytica Chimica Acta*, 565, 190–197.
- Meng, X.; Pan, Q.; Ding, Y. & Jiang, L. (2014). Rapid determination of phospholipid content of vegetable oils by FTIR spectroscopy combined with partial least-square regression. *Food Chemistry*, 147, 272–278.
- Miller J.N. & Miller, J. C. (2004). *Estadística y Quimiometría para Química Analítica*. Pearson Prentice Hall, New Jersey, USA.
- Moore, C. J.; Spink J. & Lipp. M. (2012). Development and Application of a Database of Food Ingredient Fraud and Economically Motivated Adulteration from 1980 to 2010. *Journal of Food Science*, 77, Nr. 4.
- Muntean, E. (2010). Simultaneous carbohydrate chromatography and unsuppressed ion chromatography in detecting fruit juices adulteration. *Chromatographia*, 71, 69–74.
- Patz, C. D.; Blicke, A.; Ristow, R. & Dietrich, H. (2004). Application of FT-MIR spectrometry in wine analysis. *Analytica Chimica Acta*, 513, 81–89.
- Pereira, V.; Cámara, J.S.; Cacho, J. & Marques, J.C. (2010). HPLC-DAD methodology for the quantification of organic acids, furans and polyphenols by direct injection of wine samples. *Journal of Separation Science*, 33, 1204-1215.
- Primo-Yúfera, E. (1982). *Química agrícola III. Alimentos*. Cap. 6. Cítricos y derivados. Alhambra. Madrid. España.
- Ramis Ramos, G. y García Álvarez-Coque, C. (2001) *Quimiometría*. Síntesis. Madrid. España.
- Reuter, W. M. (2015). Analysis of Organic Acids in Fruit Juices by HPLC and UV Detection, Application Note PerkinElmer Inc., Shelton, EUA.
- Saavedra, L.; García, A. & Barbas, C. (2000). Development and validation of a capillary electrophoresis method for direct measurement of isocitric, citric, tartaric and malic acids as adulteration markers in orange juice. *Journal of Chromatography A*, 881, 395-401.
- Saavedra, L.; Rupérez, F.J. & Barbas, C. (2001). Capillary electrophoresis for evaluating orange juice authenticity: a study on Spanish oranges. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 9–13.

- Scherer, R.; Poloni Rybka, A.C.; Ballus, C.A.; Dillenburg Meinhart, A.; Teixeira Filho, J. & Teixeira Godoy, H., (2012). Validation of a HPLC method for simultaneous determination of main organic acids in fruits and juices. *Food Chem.*, 135, 150–154.
- Shui, G. & Leong, L.P. (2002). Separation and determination of organic acids and phenolic compounds in fruit juices and drinks by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, 977, 89–96.
- Simpkins, W. & Harrison, M. (1995). The state of the art in authenticity testing. *Trends in Food Science & Technology*, 6, 321-328.
- Stój, A. & Targonski, Z. (2006). Use of content analysis of selected organic acids for the detection of berry juice adulterations. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* 15/56, 41–47.
- Synder, A.; Sweeney, F.; Rodriguez-Saona, L. & Giusti, M. (2014) Rapid authentication of concord juice concentration in a grape juice blend using Fourier-Transform infrared spectroscopy and chemometric analysis. *Food Chemistry*, 147, 295–301.
- Szymczycha-Madeja, A.; Welna, M.; Jedryczko, D. & Pohl, P (2014). Developments and strategies in the spectrochemical elemental analysis of fruit juices. *Trends in Analytical Chemistry*, 55, 68-80.
- Trifirò, A.; Sacconi, G.; Gherardi, S.; Vicini, E.; Spotti, E.; Previdi, M.P.; Ndagijimana, M.; Cavalli, S. & Reschiotto, C. (1997). Use of ion chromatography for monitoring microbial spoilage in the fruit juice industry. *J. Chromatogr. A*, 770, 243–252.
- Vandeginste, B.G.M.; Massart, D.L. y col. (Eds.). (1998). *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part B, Data Handling in Science and Technology*, Vol. 20, Part 2.
- Woodcock, T.; Colette, F.; O'Donnell, C. P. & Downey, G. (2007). Application of Near and Mid-Infrared Spectroscopy to Determine Cheese Quality and Authenticity. *Food Bioprocess Technol.* 1:117–129.