



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



INSTITUTO DE INGENIERÍA DE
ALIMENTOS PARA EL DESARROLLO

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

CALIBRACIÓN DE DIFERENTES PARÁMETROS FISICOQUÍMICOS EN MOSTO Y CAMELO MEDIANTE EL EQUIPO ATR ALPHA BRUKER

TRABAJO FIN DE MÁSTER UNIVERSITARIO EN CIENCIA E
INGENIERÍA DE LOS ALIMENTOS

ISMAEL BOLUDA PUCHADES

TUTOR/A ACADEMICO: JUAN ANDRÉS CÁRCEL CARRIÓN
DIRECTORA EXPERIMENTAL SECNA: PILAR FABRA ROVIRA

Curso Académico 2018/2019

VALENCIA, SEPTIEMBRE 2019

RESUMEN

El trabajo ha consistido en desarrollar distintos procedimientos y calibraciones de diferentes parámetros para su aplicación en un espectrofotómetro FTIR. Este equipo utiliza un sistema ATR: Attenuated Total Reflectance. Así se han determinado parámetros fisicoquímicos como grados Baumé, grados Brix, acidez total, pH, nitrógeno amoniacal, nitrógeno total y extracto seco, entre otros, en concentrados de mosto, extractos hidroalcohólicos y caramelos color mediante técnicas analíticas clásicas. Por otro lado, se han determinado los espectros de dichas muestras mediante el espectrofotómetro FTIR. Esto ha permitido la calibración del equipo para cada uno de los parámetros estudiados. Por último, se han comparado los resultados obtenidos con las técnicas analíticas convencionales y los resultados que aporta el espectrofotómetro, obteniendo unos resultados muy prometedores para el uso de esta técnica.

Palabras clave: Espectrofotómetro; Attenuated Total Reflectance; extracto hidroalcohólico; propiedades fisicoquímicas; calibración.

RESUM

El treball ha consistit en desenvolupar diferents procediments i calibratges de diferents paràmetres per a la seua aplicació en un espectrofotòmetre FTIR. Aquest equip utilitza un sistema ATR: Attenuated Total Reflectance. Així s'han determinat paràmetres fisicoquímics com els graus Baumé, graus Brix, acidesa total, pH, nitrogen amoniacal, nitrogen total i extracte sec, entre altres, en concentrats de most, extractes hidroalcohòlics i caramels color mitjançant tècniques analítiques clàssiques. D'altra banda, s'han determinat els espectres d'aquestes mostres mitjançant l'espectrofotòmetre FTIR. Això ha permès el calibratge de l'equip per a cadascun dels paràmetres estudiats. Finalment, s'han comparat els resultats obtinguts amb les tècniques analítiques convencionals i els resultats que aporta l'espectrofotòmetre, obtenint uns resultats molt prometedors per a l'ús d'aquesta tècnica.

Paraules clau: Espectrofotòmetre; Attenuated Total Reflectance; extracte hidroalcohòlic; propietats fisicoquímiques; calibratge.

ABSTRACT

The study has been to develop different procedures and calibrations of different parameters for application in an FTIR spectrophotometer. This equipment uses an ATR system: Attenuated Total Reflectance. Thus, physicochemical parameters such as Baumé degrees, Brix degrees, total acidity, pH, ammoniacal nitrogen, total nitrogen and dry matter have been determined, among others, in must concentrates, hydroalcoholic extracts and colored



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



INSTITUTO DE INGENIERÍA DE
ALIMENTOS PARA EL DESARROLLO

caramels by means of classical analytical techniques. On the other hand, the spectra of these samples have been determined using the FTIR spectrophotometer. This has allowed the calibration of the equipment for each of the parameters studied. Finally, we have compared the results obtained with conventional analytical techniques and the results provided by the spectrophotometer, obtaining very promising results for the use of this technique.

Key words: Spectrophotometer; Attenuated Total Reflectance; hydroalcoholic extract; physicochemical properties; calibration.



ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. La empresa.....	1
1.2. Tecnología FTIR.....	1
1.3. Objetivo del trabajo.....	2
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	3
2.1. Productos empleados en el estudio.....	3
2.2. El equipo ATR Alpha Bruker.....	3
2.3. Determinaciones experimentales de los distintos parámetros de calidad de los colorantes considerados.....	4
2.3.1. Determinación de Baumé y densidad en mostos y caramelos.....	4
2.3.2. Determinación de sólidos disueltos (grados Brix) en mostos.....	5
2.3.3. Determinación de acidez total y pH en mostos.....	5
2.3.4. Determinación de extracto seco en caramelo.....	5
2.3.5. Determinación de nitrógeno amoniacal y total en caramelo.....	5
2.4. Parámetros estadísticos.....	6
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	7
3.1. Mosto azufrado tinto (MAT).....	7
3.2. Mosto concentrado tinto (Red Grape Juice Concentrated, RGJC).....	9
3.3. Caramelo.....	12
4. CONCLUSIONES.....	18
5. BIBLIOGRAFÍA.....	19

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. Validación de la calibración de la determinación de grados Baumé en mosto azufrado tinto (MAT).....	7
TABLA 2 Validación de la calibración de la determinación de la densidad en mosto azufrado tinto (MAT).....	8
TABLA 3. Validación de la calibración de la determinación de grados Brix en mosto azufrado tinto (MAT).....	9
TABLA 4. Validación de la calibración de la determinación de la acidez total en mosto en concentrado tinto (RGJC).	10
TABLA 5. Validación de la calibración de la determinación de pH en mosto en concentrado tinto (RGJC).....	11
TABLA 6. Validación de la calibración de la determinación de grados Brix en mosto en concentrado tinto (RGJC).	12
TABLA 7. Validación de la calibración de la determinación de grados Baumé de los caramelos catalizados.	13
TABLA 8. Validación de la calibración de la determinación de la densidad de los caramelos catalizados.....	14
TABLA 9. Validación de la calibración de la determinación de N amoniacal de los caramelos catalizados.....	15
TABLA 10. Validación de la calibración de la determinación N total de los caramelos catalizados.....	15
TABLA 11. Validación de la calibración de la determinación del extracto seco de caramelos catalizados.....	16
TABLA 12. Validación de la calibración de la determinación del extracto seco en los caramelos Burnt sugar.....	17
TABLA 13. Resumen de las calibraciones por parámetros.	17

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Logo corporativo Secna.	1
FIGURA 2. Sistema ATR.....	2
FIGURA 3. Equipo ATR Alpha Bruker.	3
FIGURA 4. Recta de calibración de los grados Baumé correspondiente a mosto tinto azufrado (MAT).	7
FIGURA 5. Recta de calibración de la densidad correspondiente a mosto azufrado tinto (MAT).	8
FIGURA 6. Recta de calibración de los grados Brix correspondiente a mosto azufrado tinto (MAT).	9
FIGURA 7. Recta de calibración de la acidez total correspondiente a mosto concentrado tinto (RGJC).....	10
FIGURA 8. Recta de calibración del pH correspondiente a mosto concentrado tinto (RGJC).....	11
FIGURA 9. Recta de calibración de los grados Brix correspondiente a mosto concentrado tinto (RGJC).....	12
FIGURA 10. Recta de calibración de los grados Baumé correspondiente a los caramelos catalizados.....	13
FIGURA 11. Recta de calibración de la densidad correspondiente a los caramelos catalizados.....	14
FIGURA 12. Recta de calibración del N amoniacal de caramelos catalizados.	14
FIGURA 13. Recta de calibración del N total correspondiente a los caramelos catalizados.....	15
FIGURA 14. Recta de calibración del extracto seco correspondiente a los caramelos catalizados.....	16
FIGURA 15. Recta de calibración del extracto seco correspondiente a los caramelos Burnt sugar.	16

1. INTRODUCCIÓN.

1.1. La empresa.

El presente Trabajo Fin de Máster se ha realizado en las instalaciones de SECNA Natural Colors. Esta empresa forma parte de un grupo empresarial originario de Italia cuyo inicio se remonta al año 1961 en Bolate (Milán). En el año 1967 se estableció en Benifayó (Valencia), ampliando así sus fronteras y en 2015, se trasladó al polígono El Muladar de Chiva (Valencia). Dentro del grupo empresarial cabe destacar: EG Industriale situada al sur de Italia (Ceriñola); Erkon Koncentrate (Turquía) que se incorporó al grupo en 2008 y cuya principal actividad es la producción de black carrot (zanahora negra) y Vitivinícola Ramirez (Utiel, Valencia), integrada al grupo en el año 2012.



FIGURA 1. Logo corporativo Secna.

En la empresa se desarrollan productos colorantes como antocianinas procedentes de uva, zanahoria negra y remolacha, zumos concentrados de uva tinta y blanca y caramelo, cuyas aplicaciones son muy variadas (zumos, postres, mermeladas, productos de bollería, etc.). Se dispone de una tecnología muy avanzada en equipos de filtrado, reactores, atomizadores, concentradores, equipos de envasado aséptico, equipos de frío y pasteurizadores.

Por último, cabría destacar la gran cantidad de certificados y acreditaciones que tiene la empresa. Entre ellos se podría destacar la ISO 22000:2005, FSSC 22000:2011, certificación Halal y otros como la Certificación de producto orgánico, certificado Kosher, certificado Non GMO y HACCP Quality System. El hecho de trabajar con muchas y diferentes referencias hace que resulta de suma importancia el disponer de métodos de análisis y control rápidos tanto para las materias primas como para los propios procesos de producción.

1.2. Tecnología FTIR.

En la industria alimentaria es de gran importancia para el buen funcionamiento la aplicación de métodos rápidos y fiables para la inspección y control de la producción. Entre las diferentes tecnologías de inspección en línea no destructiva destacan las relacionadas con técnicas espectroscópicas, y entre ellas, las que consideran longitudes de onda en el orden del infrarrojo. Tanto desde el punto de vista instrumental como de sus aplicaciones, es conveniente dividir la región infrarroja en tres regiones denominadas infrarrojo cercano (NIR), infrarrojo medio (MIR) e infrarrojo lejano (FIR). La gran mayoría de las aplicaciones analíticas clásicas de la espectroscopia infrarroja se basan en el

empleo del infrarrojo medio, ya que además proporciona la posibilidad de convertir esta técnica en una técnica cuantitativa.

La obtención de espectros en el infrarrojo se puede llevar a cabo a través de las siguientes técnicas de medida:

- Transmisión. En este método de medida, la radiación infrarroja atraviesa la muestra registrándose la cantidad de energía absorbida por la muestra.
- Reflexión. Dado que parte de la radiación infrarroja es reflejada sobre la muestra, esta técnica consiste en analizar la radiación reflejada y compararla con la radiación incidente. Esto ofrece información molecular de la muestra.
- Modo ATR de las siglas en inglés Attenuated Total Reflectance (reflectancia total atenuada). Es una técnica que permite medir muestras de forma directa sobre la superficie de un cristal de diamante o germanio obteniéndose espectros de forma muy rápida y con muy buena resolución. Funciona mediante la medición de los cambios que se producen en un haz de infrarrojos reflejado internamente cuando el haz entra en contacto con una muestra. El haz de infrarrojos se dirige a un cristal denso ópticamente con un alto índice de refracción en determinado ángulo. Esta reflectancia interna crea una onda evanescente que se extiende más allá de la superficie del cristal hasta la muestra en contacto con el cristal. En las regiones del espectro de infrarrojo en las que la muestra absorbe energía, la onda evanescente se atenúa. El haz atenuado vuelve al cristal, sale a continuación por el extremo opuesto del cristal y se dirige al detector. Éste genera un interferograma y, mediante la aplicación de la transformada de Fourier, se genera el espectro correspondiente.

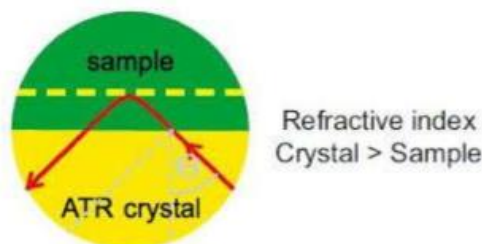


FIGURA 2. Sistema ATR.

En este sentido, un equipo ATR puede ser una alternativa interesante para el estudio y análisis de parámetros fisicoquímicos de las materias primas y productos que se manejan en las industrias de colorantes.

1.3. Objetivo del trabajo.

En base a lo establecido anteriormente, el objetivo del trabajo ha sido desarrollar distintos procedimientos y calibraciones de diferentes parámetros fisicoquímicos de interés en colorantes que permitan su aplicación en un espectrofotómetro FTIR, para el control de calidad de estos mismos.

2. MATERIALES Y MÉTODOS.

2.1. Productos empleados en el estudio.

De entre la gran variedad de productos que se desarrollan en la empresa, para la realización del presente estudio se seleccionaron los siguientes: mosto azufrado tinto, mosto concentrado tinto y caramelo color. En cada uno de ellos se fijaron una serie de parámetros a estudiar.

El primer producto fue el mosto azufrado tinto (MAT), que es la materia prima que se utiliza para obtener los antocianos procedentes de uva. Para este producto se han estudiado parámetros como el contenido en azúcar a través de la determinación de los grados Baumé, la densidad y el contenido de sólidos en suspensión expresados en grados Brix.

Otro de los productos fue el mosto concentrado tinto, denominado en el mercado como red grace juice concentrated (RGJC). Este se utiliza para obtener mediante extracción la encianina, también conocida con el código E-163. En el RGJC se determinaron parámetros como la acidez total, el pH y, otra vez, los grados Brix.

El último producto estudiado fue el caramelo color. Este producto es ampliamente empleado en el sector de la alimentación con numerosas aplicaciones como bebidas alcohólicas, bollería y postres, entre otros. Dentro de la gama de caramelos se pueden encontrar, en primer lugar, los denominados "Caramelo Color", E-150, que se obtienen mediante el tratamiento térmico controlado de la glucosa en presencia de compuestos ácidos o básicos. En segundo lugar, los Burnt Sugar (azúcar quemado) que se obtienen mediante tratamiento térmico controlado de la sacarosa y jarabe de glucosa, sin añadir aditivos. Por último, hay que mencionar a los caramelos aromáticos.

Los parámetros considerados en el caso del caramelo color fueron los grados Baumé, la densidad, el nitrógeno amoniacal, el nitrógeno total y el extracto seco. En el caso del Burnt Sugar solamente se estudió el extracto seco.

2.2. El equipo ATR Alpha Bruker.

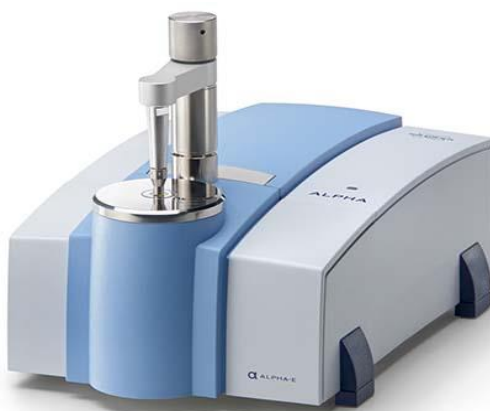


FIGURA 3. Equipo ATR Alpha Bruker.

El presente trabajo fin de máster se ha desarrollado con un espectrofotómetro ATR modelo Alpha (Bruker). El espectro que utiliza el equipo se encuentra en el rango del infrarrojo medio. Está basado en un sistema en ATR, en el cual las muestras se pueden medir sin necesidad de ser filtradas. También funciona con muestras con gases disueltos, e incluso sólidos.

El sistema dispone de un software interno que permite realizar calibraciones basadas en quimiometría. Las muestras se introducen de manera sencilla en el sistema y éste realiza la medida generando un espectro. Paralelamente, se realizan las determinaciones experimentales del parámetro que se esté estudiando y el valor obtenido se introduce en el sistema. Entonces, éste asocia el espectro de la muestra analizado con el valor experimental introducido. Esta operación se repite con diferentes muestras.

Una vez que se considere que hay un número de muestras suficiente, se procede a realizar la calibración. El software interno del equipo aplica un algoritmo matemático asociando los valores experimentales de la variable con los espectros ya obtenidos. Al final se obtiene la calibración junto con una serie de parámetros estadísticos que evalúan la calidad del ajuste.

Esta calibración se puede mejorar incluyendo más muestras que amplíen la base de datos del equipo.

2.3. Determinaciones experimentales de los distintos parámetros de calidad de los colorantes considerados.

Todos los métodos experimentales que se describen a continuación han seguido los protocolos correspondientes que se utilizan en la empresa.

2.3.1. Determinación de Baumé y densidad en mostos y caramelos.

La determinación del grado Baumé se realizó a 15°C mediante el uso de un aerómetro. Esta se realizó para mosto azufrado tinto (MAT). Consiste en llenar una probeta de 250 cc con el mosto. Después se introduce en ellas un aerómetro, cuyos valores dependen del colorante a medir. Así, para MAT se utilizó uno con valores comprendidos entre 10 y 20 mientras que, para el caramelo, uno con valores comprendidos entre 30 y 40. A su vez, se midió la temperatura del colorante y se aplicó la siguiente ecuación:

$$^{\circ}\text{Baumé} = \text{Lectura aerómetro} + \frac{\text{Temperatura}-15}{22} \quad (1)$$

En lo referente a la densidad, se utilizó un densímetro digital “Mettler Toledo DE45”. En este caso, la lectura es proporcionada como masa volúmica. Por tanto, siguiendo las instrucciones del equipo, para obtener el valor de densidad a 20 °C se debe dividir el valor obtenido entre 0,998203.

2.3.2. Determinación de sólidos disueltos (grados Brix) en mostos.

La determinación del contenido de sólidos disueltos expresados en grados Brix se realizó mediante un refractómetro marca Abbe. Este sistema atempera la muestra a 20 °C y después se procede a la lectura refractométrica de los grados Brix. Este procedimiento fue utilizado tanto para mosto azufrado tinto (MAT) como para mosto concentrado (Red Grape Juice Concentrated).

2.3.3. Determinación de acidez total y pH en mostos.

La determinación de acidez total se llevó a cabo en el mosto concentrado (RGJC). Ésta es una determinación de los ácidos titulables cuando se lleva la muestra a pH 8,1 por adición de una solución alcalina. Para ello, se pesan entre 7 y 10 gramos de sustancia en un vaso de 250 mL y se añaden 100 mL de agua destilada. La mezcla se sitúa en un agitador y se procede a valorar en un pH-metro con una solución de hidróxido sódico 0,1 N hasta que se alcance un pH de 8,1. La acidez total se expresa como porcentaje de ácido tartárico siguiendo la ecuación 2:

$$\% \text{ác. tartárico} = \frac{\text{mL hidróxido sódico} \cdot \text{Normalidad} \cdot 7,5}{\text{Peso muestra}} * 100 \quad (2)$$

El pH en mosto concentrado se determinó mediante medida directa en el pH-metro Crison GLP21.

2.3.4. Determinación de extracto seco en caramelo.

La determinación del extracto seco en caramelo líquido se realizó mediante la desecación de la muestra a 105 °C. Para ello, en una bandeja metálica capaz de soportar altas temperaturas, se pesaron unos 2 g de sustancia y se introdujo en estufa durante un mínimo de 24 horas. Pasado este tiempo, se extrajo la muestra y se enfrió, se pesó y se obtuvo el extracto seco mediante la ecuación 3:

$$\text{Extracto seco } \% = \frac{(P3 - P1)}{P2} * 100 \quad (3)$$

Siendo P1 el peso de la bandeja, P2 el peso del caramelo y P3 el peso de bandeja con el caramelo seco una vez pasadas las 24 horas.

2.3.5. Determinación de nitrógeno amoniacal y total en caramelo.

Dado que en la fabricación de algunos caramelos se utilizan compuestos amoniacales (hidróxido amónico en su formulación) para catalizarlos, resulta imprescindible realizar en este tipo de producto determinaciones de nitrógeno amoniacal y total. Estos deben estar dentro de unos límites legales en el producto acabado.

En el caso del nitrógeno amoniacal, se utilizó el método de Kjeldahl. Este consiste en transferir a un matraz entre 2 y 3 g de caramelo, 200 mL agua

destilada y 2 g de óxido de magnesio en polvo, que actúa de catalizador. Por otra parte, se añaden a un Erlenmeyer 30 mL de ácido sulfúrico 0,1 N y una gota de indicador. Este Erlenmeyer se conecta a la salida del condensador del aparato de destilación, de manera que el tubo de salida este dentro del Erlenmeyer.

Una vez montado el sistema, se inicia un proceso de destilación hasta recoger 100 mL de destilado. Durante el mismo, se comprueba que el valor de pH es igual a 7 con tiras de pH. Posteriormente, se valora la solución con hidróxido sódico 0,1 N y se utiliza la ecuación siguiente para determinar el % de nitrógeno amoniacal:

$$\% \text{ N amoniacal} = \frac{(\text{mL ácido sulfúrico} - \text{mL hidróxido sódico}) * 0,1 * 14}{1000} * 100 \quad (4)$$

La determinación de nitrógeno total se asemeja bastante a la del nitrógeno amoniacal incluyendo previamente un proceso de digestión. Para ello, se pesan entre 1 y 3 g de caramelo en el matraz de Kjeldahl y se añaden 20 mL de ácido sulfúrico concentrado. La mezcla se lleva a ebullición hasta que el líquido quede transparente. Después, se enfría y se añaden 200 mL de agua destilada y 100 mL de hidróxido sódico al 50%, de manera que el líquido queda alcalino. Una vez realizado este paso, se conecta al condensador de la misma forma que en el caso de las determinaciones de nitrógeno amoniacal anteriormente mencionado, se valora la solución con hidróxido sódico 0,1 N y se aplica la ecuación 4.

2.4. Parámetros estadísticos.

El equipo proporciona una serie de parámetros estadísticos que permiten evaluar la calidad de la calibración. Entre ellos, cabe mencionar al coeficiente de determinación o R^2 , que determina la calidad del modelo para replicar los resultados y la proporción de variación de los resultados que puede explicarse por el modelo. Éste, a su vez, en una regresión lineal es el cuadrado del coeficiente de correlación o r que se utiliza para medir el grado de relación de dos variables siempre que ambas sean cuantitativas. En estos dos valores siempre se busca que sean cercanos a 1.

Por otra parte, también se proporciona la desviación residual predictiva o RPD. Cuanto más alto es el valor de la RPD, mayor será la capacidad del modelo de calibración para predecir con exactitud los valores del parámetro de referencia. Según Nicolai et al. (2007) una RPD superior a 2,5 corresponde a una excelente precisión de la predicción.

Y, por último, el sistema también proporciona el error estándar de validación cruzada o RMSECV, que es un valor similar a la desviación estándar y que se considera el error de validación. Cuanto menor sea este valor más ajustada será la calibración.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Los resultados obtenidos se presentan en el siguiente orden: primero el mosto azufrado tinto, se sigue por el mosto concentrado y se finaliza por el caramelo. Este orden es el que se ha seguido durante el desarrollo experimental, incorporando gradualmente parámetros al trabajo diario.

3.1. Mosto azufrado tinto (MAT).

La calibración en el caso de los grados Baumé de mosto azufrado tinto se realizó con 328 muestras diferentes. Los resultados de dicha calibración se muestran en la Figura 1.

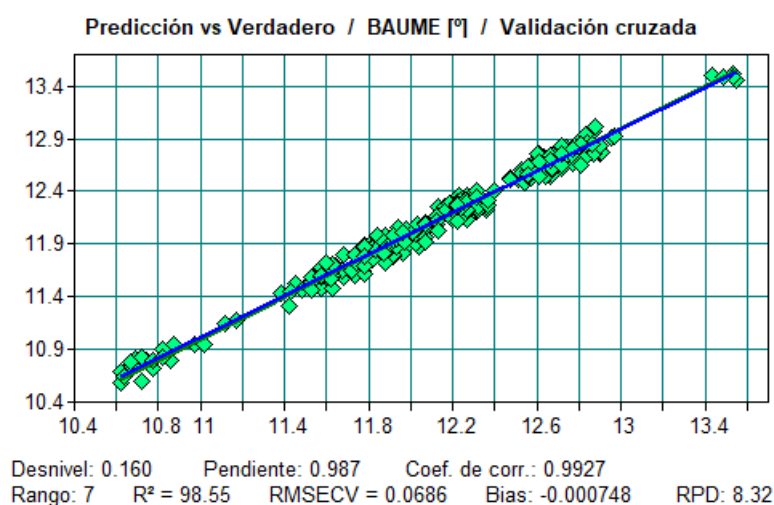


FIGURA 4. Recta de calibración de los grados Baumé correspondiente a mosto tinto azufrado (MAT).

En la Figura 4 se observa la buena correlación entre datos experimentales y calculados mostrando ambos la misma tendencia. Además, se obtuvieron valores del coeficiente de determinación de 98,55 (R^2), un coeficiente de correlación muy cercano a 1, y un error relativamente bajo de 0,0686.

Por otra parte, una RPD superior a 2,5 corresponde a una excelente precisión de la predicción. Así pues, una RPD de 8,32 es un valor excelente e indica una precisión elevada de la predicción del método.

La calibración realizada se validó con muestras independientes. Como se puede observar en la Tabla 1 se obtuvo una gran similitud entre los valores predichos y los reales.

<i>Muestra</i>	<i>Experimental</i>	<i>Predicción</i>
MAT 1	12,72	12,75
MAT 2	12,12	12,15
MAT 3	12,07	12,09

TABLA 1. Validación de la calibración de la determinación de grados Baumé en mosto azufrado tinto (MAT).

En lo referente a la densidad del mosto azufrado tinto, la calibración se realizó con 8731 espectros de los cuales 328 se obtuvieron con muestras de mosto

procedentes de la propia empresa (SECNA). Los 8403 espectros restantes se encuentran contenidos en la base de datos del equipo.

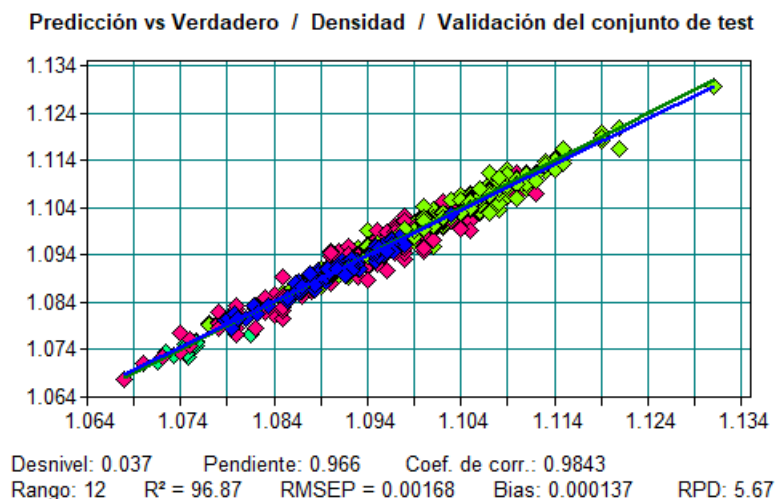


FIGURA 5. Recta de calibración de la densidad correspondiente a mosto azufrado tinto (MAT).

Debido a la gran cantidad de muestras que se utilizó en este caso, la calibración obtenida permitió ajustar mucho los valores predichos a la realidad. La aceptación fue elevada obteniendo un R² de 96,87. Este hecho se puede comprobar en los valores de los datos adjuntos de la Figura 5, como el valor del error, que es ínfimo, o el coeficiente de correlación tan cercano a 1.

<i>Muestra</i>	<i>Experimental</i>	<i>Predicción</i>
MAT 1	1,0961	1,0951
MAT 2	1,0911	1,0907
MAT 3	1,0911	1,0915
MAT 4	1,0907	1,0909

TABLA 2 Validación de la calibración de la determinación de la densidad en mosto azufrado tinto (MAT).

En cuanto al último parámetro del mosto azufrado tinto que se calibró, los grados Brix, el ajuste se realizó con 9048 espectros, de los cuales 223 se obtuvieron a partir de muestras de la empresa SECNA y 8825 correspondieron con valores contenidos en la base de datos del equipo.

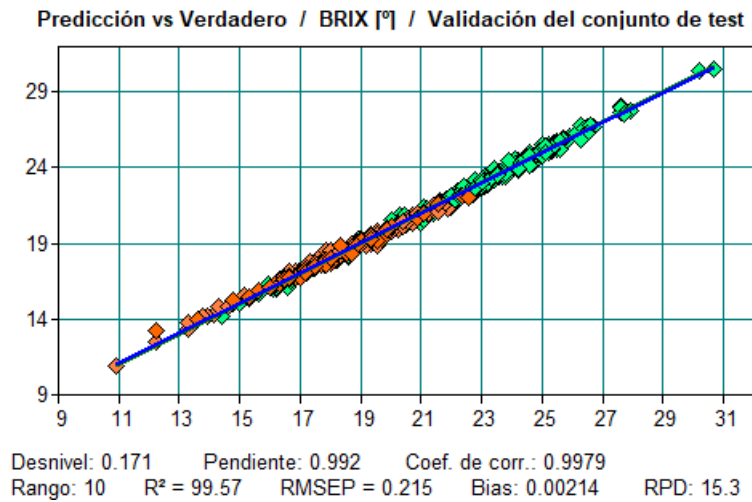


FIGURA 6. Recta de calibración de los grados Brix correspondiente a mosto azufrado tinto (MAT).

<i>Muestra</i>	<i>Experimental</i>	<i>Predicción</i>
MAT 1	21,49	21,50
MAT 2	21,42	21,34
MAT 3	21,48	21,47
MAT 4	21,12	21,36

TABLA 3. Validación de la calibración de la determinación de grados Brix en mosto azufrado tinto (MAT).

Tanto en los parámetros estadísticos que se muestran en la Figura 6 como en la comparación entre datos experimentales y predichos por la calibración mostrados en la Tabla 3 se observa la calidad de la calibración y la robustez de la predicción.

3.2. Mosto concentrado tinto (Red Grape Juice Concentrated, RGJC)

El mosto concentrado tinto comercial es producido con dos grados de concentración, 65 y 68 grados Brix. Esta especificidad es común en el sector. Posteriormente a su venta, el cliente lo diluye hasta los 16 grados Brix para venderlo como zumo.

En el caso del RGJC, la calibración se centró en parámetros como la acidez total, el pH y los grados Brix. La calibración de la acidez total se realizó con 269 muestras, y se obtuvieron los resultados que se muestran en la Figura 7:

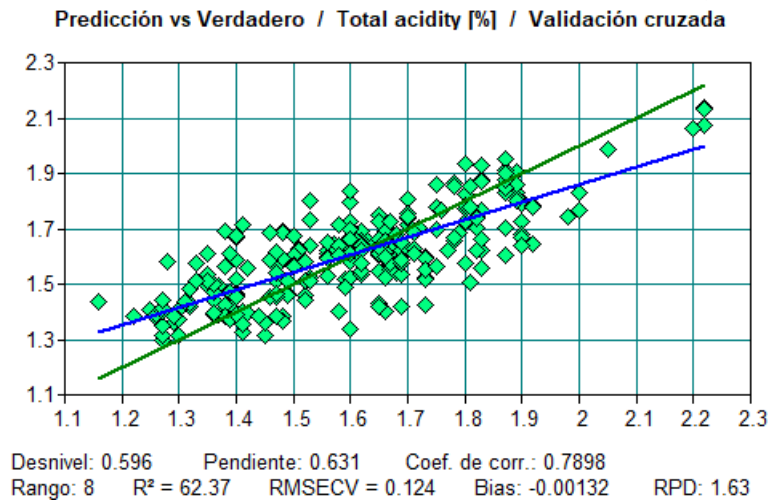


FIGURA 7. Recta de calibración de la acidez total correspondiente a mosto concentrado tinto (RGJC).

Como se puede observar, en este caso, la recta calibración obtenida no resultó satisfactoria. Esto también se puede observar en el bajo valor de la R^2 y del coeficiente de correlación. Además, se obtiene un RPD menor a 2,5 que demuestra la debilidad del ajuste. En principio, estos resultados indican que se debería incrementar el espectro con más muestras para obtener una calibración más ajustada.

Por un lado, la determinación de acidez puede estar muy afectada por la materia prima. De hecho, existen mostos con un mayor contenido en ácido láctico y otros con mayor contenido en ácido tartárico. Hay que tener en cuenta que, en este caso, la acidez se expresó como porcentaje de ácido tartárico.

Por otro lado, el hecho de que la predicción no se ajuste correctamente a los datos experimentales puede ser debido a que factores como el color o los grados Brix puedan intervenir camuflando parcialmente la acidez. Sería necesario profundizar la investigación en esta dirección. Una posible solución podría ser realizar la calibración de manera separada en los dos tipos de mostos concentrados que se analizaron de manera conjunta, es decir, de 65 y de 68 grados Brix. Otra opción sería establecer diferentes rangos de color realizando calibraciones de acidez para muestras con colores bajos y otra para colores altos.

<i>Muestra</i>	<i>Experimental</i>	<i>Predicción</i>
RGJC 1	1,82	1,74
RGJC 2	1,69	1,58
RGJC 3	1,50	1,66
RGJC 4	1,67	1,72

TABLA 4. Validación de la calibración de la determinación de la acidez total en mosto en concentrado tinto (RGJC).

En cuanto a la calibración del pH, se ha realizado con 3846 espectros. De ellos, 269 se obtuvieron a partir de muestras de la empresa SECNA. Los 3577 datos restantes se tomaron de la base de datos del equipo.

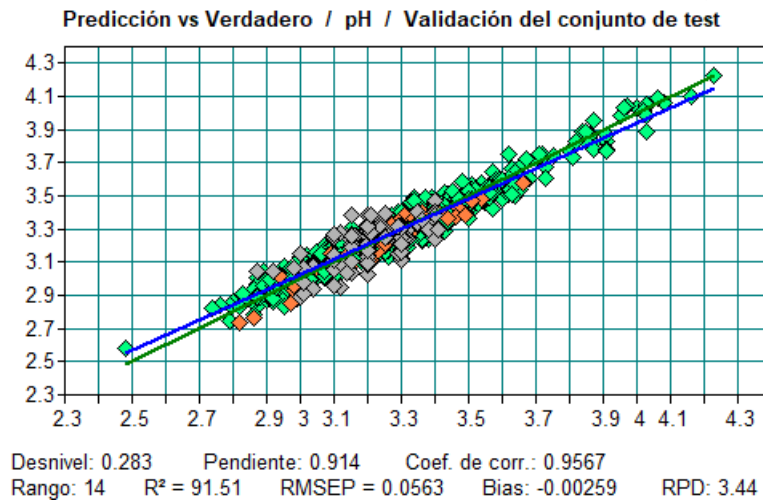


FIGURA 8. Recta de calibración del pH correspondiente a mosto concentrado tinto (RGJC).

Respecto a la calibración del pH en mosto concentrado tinto, cabe destacar unos parámetros estadísticos que indicarían que la calibración de este parámetro resulta difícil. Así, se obtiene un RPD superior a 2,5 lo que indica una buena predicción. Sin embargo, los valores de R² y del coeficiente de correlación son relativamente bajos, como se puede observar en la Figura 8. Dada la gran cantidad de datos que se han introducido, estos valores tan bajos indican que el pH es un parámetro de difícil resolución.

<i>Muestra</i>	<i>Experimental</i>	<i>Predicción</i>
RGJC 1	2,95	2,88
RGJC 2	2,80	2,91
RGJC 3	3,40	3,34
RGJC 4	3,01	2,96

TABLA 5. Validación de la calibración de la determinación de pH en mosto en concentrado tinto (RGJC).

El último parámetro estudiado en RGJC fue el contenido de sólidos solubles medido en grados Brix. En este caso, la calibración se realizó con las medidas realizadas en 269 muestras, todas ellas procedentes de la empresa. Sin embargo, existen dos tipos de producto en la empresa, los mostos concentrados tintos que se encuentran con un contenido de sólidos en suspensión en torno a 65 grados Brix y los que se encuentran en torno a 68 grados Brix. Es por ello por lo que, como se puede observar en la Figura 6, se identificaron dos zonas claramente diferenciadas por tipo de producto: 65 y 68 grados Brix.

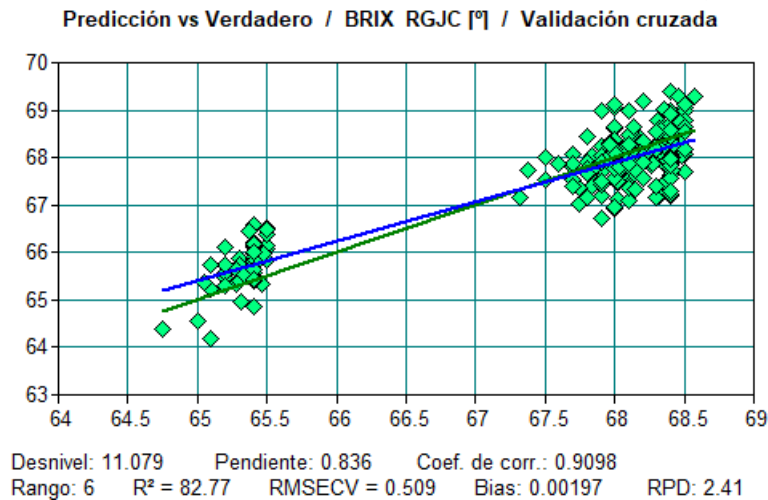


FIGURA 9. Recta de calibración de los grados Brix correspondiente a mosto concentrado tinto (RGJC).

<i>Muestra</i>	<i>Experimental</i>	<i>Predicción</i>
RGJC 1	68,50	68,20
RGJC 2	65,40	65,43
RGJC 3	67,96	68,18

TABLA 6. Validación de la calibración de la determinación de grados Brix en mosto en concentrado tinto (RGJC).

La calibración que se observa en la Figura 9 resulta no demasiado buena y aparentemente mejorable. Sin embargo, los valores mostrados en la Tabla 6, correspondientes a las últimas mediciones realizadas, demuestran que la aceptabilidad fue relativamente buena y que el sistema predice de manera bastante fiable los grados Brix del mosto concentrado.

Los parámetros estadísticos indican que la predicción no fue muy fiable, ya que, por ejemplo, su RPD identificada estuvo cercana a 2,5 pero no la superó, y los valores de su coeficiente de correlación y su coeficiente de determinación R² no fueron bajos. Esto podría atribuirse al efecto del color. Así, cuando el color es elevado, puede afectar a la medida de los grados Brix obtenida. Se comprobó que en estos casos, la medida obtenida con el refractómetro fue mayor que el obtenido con el aerómetro. Al igual que en la acidez, se deberían hacer rectas de calibración para zumos de uva con color bajo y con color alto.

3.3. Caramelo.

Como ya se ha comentado, existen diferentes tipos de caramelo. En el estudio y desarrollo de calibraciones se han utilizado únicamente dos tipos: el caramelo color, también llamados caramelos catalizados (E-150), que se obtienen mediante el tratamiento térmico controlado de la glucosa en presencia de compuestos ácidos o básicos, y los caramelos de tipo Burnt Sugar (BS, azúcar quemado) que se obtienen mediante tratamiento térmico controlado de la sacarosa y jarabe de glucosa, sin añadir aditivos.

En el caso de los caramelos catalizados, se realizó el análisis de parámetros fisicoquímicos como los grados Baumé, densidad, nitrógeno amoniacal y

nitrógeno total. En cuanto a la calibración de los grados Baumé, ésta se realizó con 39 muestras.

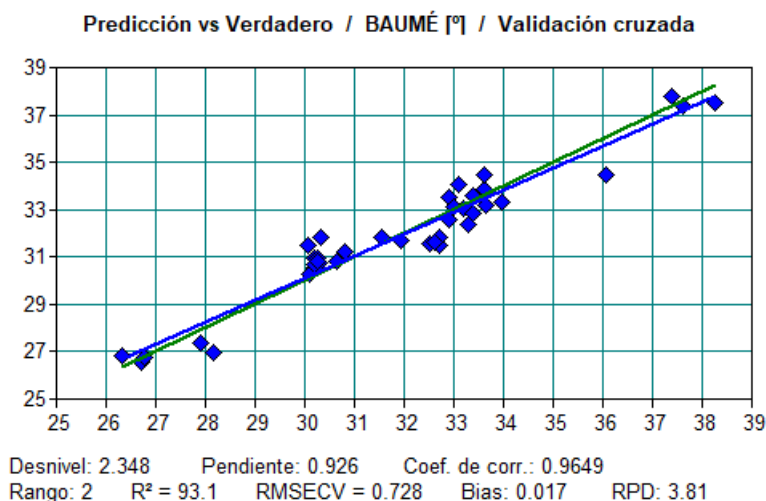


FIGURA 10. Recta de calibración de los grados Baumé correspondiente a los caramelos catalizados.

<i>Muestra</i>	<i>Experimental</i>	<i>Predicción</i>
CAR 1	30,26	30,79
CAR 2	31,92	31,69
CAR 3	32,90	32,62

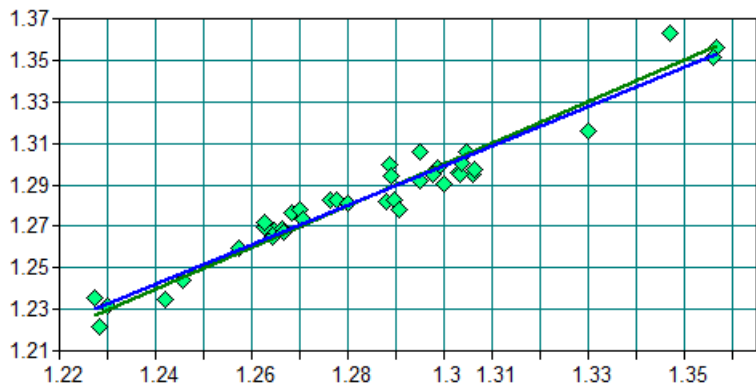
TABLA 7. Validación de la calibración de la determinación de grados Baumé de los caramelos catalizados.

En este caso, se obtuvo una buena predicción, como indica el elevado valor de RPD obtenido. De hecho, la predicción se ajusta en gran medida a los valores obtenidos de manera experimental. Así, el coeficiente de correlación y el error o RMSECV son mejorables. Por tanto, se debería aumentar el número de muestras analizadas, los tipos de caramelo considerado y la cantidad de repeticiones.

Respecto a la densidad de los caramelos catalizados la calibración se ha realizado también con las mismas 39 muestras.

Los resultados de la calibración, como se puede observar en la siguiente Tabla 8, son similares a los mostrados anteriormente con los grados Baumé del caramelo. Por lo tanto, se debería aumentar el campo de muestras para poder mejorar la predicción. Es de destacar que, a nivel industria, este parámetro no es tan utilizado en caramelos como los grados Baumé.

Predicción vs Verdadero / Densidad CAR [g/mL] / Validación cruzada



Desnivel: 0.059 Pendiente: 0.954 Coef. de corr.: 0.9725
Rango: 3 $R^2 = 94.56$ RMSECV = 0.00721 Bias: 8.07E-005 RPD: 4.29

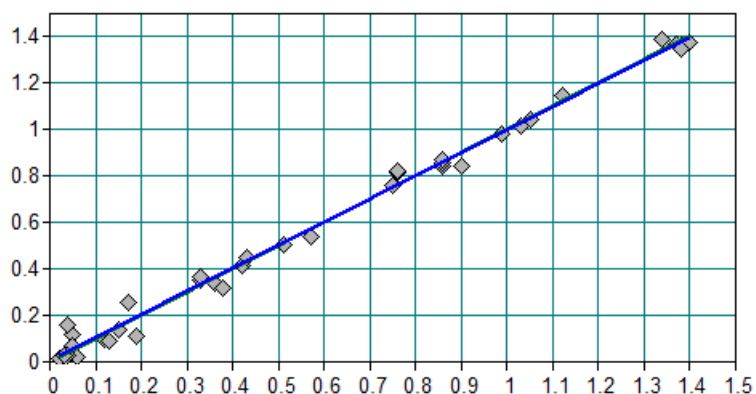
FIGURA 11. Recta de calibración de la densidad correspondiente a los caramelos catalizados.

<i>Muestra</i>	<i>Experimental</i>	<i>Predicción</i>
CAR 1	1,2667	1,2672
CAR 2	1,2821	1,2812
CAR 3	1,2310	1,2314
CAR 4	1,2999	1,2922

TABLA 8. Validación de la calibración de la determinación de la densidad de los caramelos catalizados.

El siguiente parámetro que se consideró fue el contenido de nitrógeno amoniacal porque, como se comentó anteriormente, resulta necesario determinar por utilizarse en la fabricación de algunos tipos de caramelo. En este caso, se utilizaron las 39 muestras de caramelos catalizados para la calibración.

Predicción vs Verdadero / N amoniacal [%] / Validación cruzada



Desnivel: 0.006 Pendiente: 0.992 Coef. de corr.: 0.9962
Rango: 7 $R^2 = 99.24$ RMSECV = 0.0405 Bias: -0.00163 RPD: 11.5

FIGURA 12. Recta de calibración del N amoniacal de los caramelos catalizados.

Cabe destacar la buena precisión de la predicción obtenida para este parámetro, a pesar de la haber analizado solo 39 muestras para la calibración. Así, se obtuvo un RPD de 11,5 y un R^2 de 99,24.

En el estudio, se ha intentado cubrir toda la variedad de caramelos producidos con amoníaco en la empresa y los resultados son buenos. Sin embargo, para ajustar de manera aún más fiable, se podría realizar más repeticiones de medidas e incorporarlas a la recta de calibración.

<i>Muestra</i>	<i>Experimental</i>	<i>Predicción</i>
CAR 1	1,40	1,39
CAR 2	0,86	0,86
CAR 3	0,03	0,03

TABLA 9. Validación de la calibración de la determinación de N amoniacal de los caramelos catalizados.

En cuanto a la calibración obtenida para el contenido de nitrógeno total, el número de muestras realizadas resultó escaso debido a la tardía incorporación de este parámetro en el estudio y la dificultad y tardanza del método tradicional. Sin embargo, los resultados obtenidos con tan solo 11 muestras indican una buena proyección.

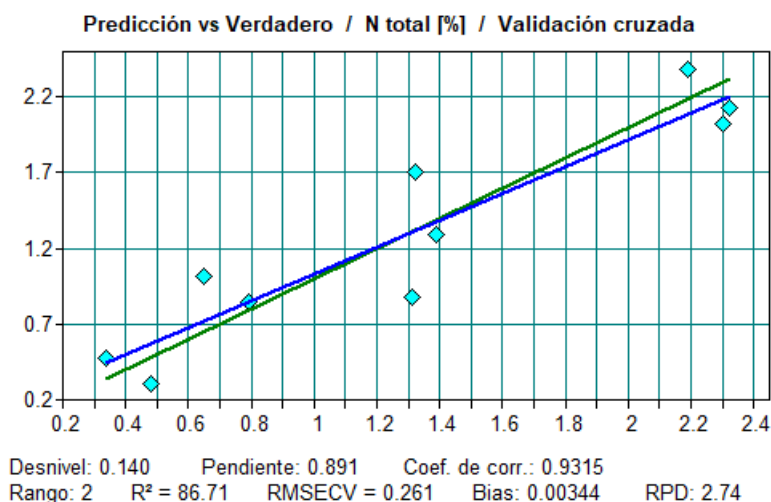


FIGURA 13. Recta de calibración del N total correspondiente a los caramelos catalizados.

<i>Muestra</i>	<i>Experimental</i>	<i>Predicción</i>
CAR 1	0,79	0,82
CAR 2	0,34	0,38
CAR 3	1,39	1,30

TABLA 10. Validación de la calibración de la determinación N total de los caramelos catalizados.

Durante el desarrollo de la calibración del extracto seco, se buscó aumentar el campo de caramelos analizables introduciendo en la calibración a los caramelos Burnt Sugar (BS). Los primeros resultados obtenidos mostraron un mal ajuste ya que los espectros resultaron muy diferentes. Por ello, se decidió crear una calibración propia para este tipo de caramelos..

Así, la calibración de los caramelos catalizados se realizó con 39 muestras y los resultados se muestran en la Figura 14.

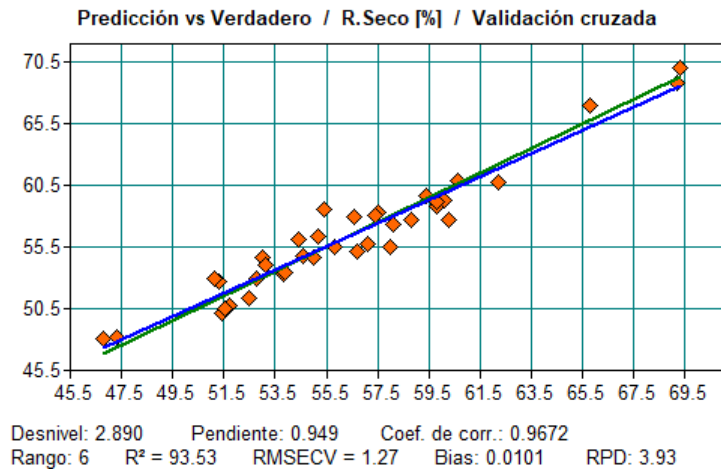


FIGURA 14. Recta de calibración del extracto seco correspondiente a los caramelos catalizados.

<i>Muestra</i>	<i>Experimental</i>	<i>Predicción</i>
CAR 1	60,60	61,10
CAR 2	52,79	52,89
CAR 3	56,56	56,71

TABLA 11. Validación de la calibración de la determinación del extracto seco de caramelos catalizados.

En este caso, a pesar de que los parámetros estadísticos no son tan favorables como en otros casos, se puede ver que la predicción resultó bastante buena. Los valores predichos se acercan bastante a los valores experimentales. Esto indicaría que el ajuste sería susceptible de ser mejorado con un número mayor de repeticiones, ya que el error es todavía demasiado alto.

En el caso de la calibración con caramelo tipo Burnt Sugar (BS), se analizaron 42 muestras. Sería posible aumentar el número de muestras y añadir otros caramelos del tipo BS para abarcar todo el campo de este tipo de caramelos.

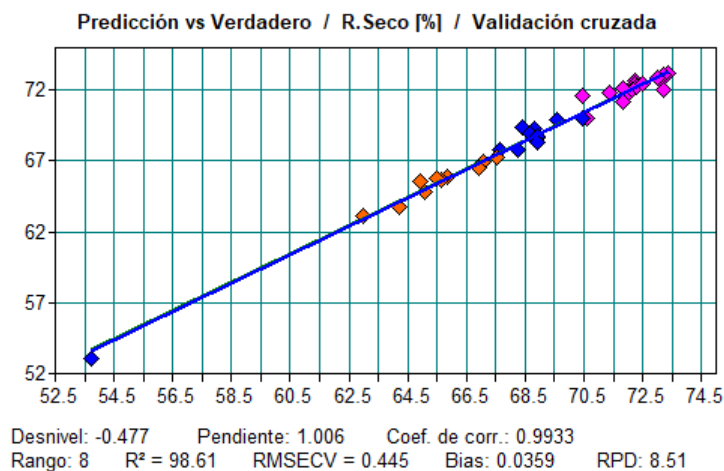


FIGURA 15. Recta de calibración del extracto seco correspondiente a los caramelos Burnt sugar.

<i>Muestra</i>	<i>Experimental</i>	<i>Predicción</i>
BS 1	72,50	72,49
BS 2	73,00	72,98
BS 3	65,10	64,91
BS 4	70,46	70,34

TABLA 12. Validación de la calibración de la determinación del extracto seco en los caramelos Burnt sugar.

Experimentalmente y en el día a día se observa que es una calibración muy fiable y ajustada a la realidad por tener muchas muestras del mismo tipo repetidas en la calibración: 18 de BS7, 13 de BS200 y 11 de BS111. Aunque el error no es bajo, todos los demás parámetros estadísticos son muy buenos y, además, como se ve en la Tabla 12, los valores se ajustan en gran medida a los valores reales.

Una gran ventaja que tiene el equipo ATR Alpha Bruker es su versatilidad y la posibilidad de realizar calibraciones para parámetros totalmente distintos a los estudiados. Aunque para ciertos parámetros se tiene una base de datos, para otros parámetros se pueden crear calibraciones y estudiar cómo se ajustan.

En la Tabla 13 se puede observar cómo hay parámetros que se calibran mejor debido a sus propias características, como por ejemplo el extracto seco o el nitrógeno amoniacal. Otros, como el pH, resulta difícil encontrar una calibración aceptable con el equipo.

Por último, cabe destacar que, si el espectro analizado no está dentro de rango de la calibración, la predicción que se realiza no es tan exacta como cuando sí lo está. Si dicho espectro se acompaña con una medida experimental del parámetro y se añade a la calibración, se aumenta el rango de la misma y se ajustarían más las predicciones.

<i>Parámetro</i>	<i>Producto</i>	<i>Rango de valores</i>	R^2	r	<i>RMSECV</i>	<i>RPD</i>
<i>Baumé</i>	MAT	10,62-13,55	98,55	0,9927	0,0686	8,32
<i>Densidad</i>	MAT	1,07-1,135	96,87	0,9843	0,00168	5,67
<i>Brix</i>	MAT	7,34-30,2	99,57	0,9979	0,215	15,3
<i>Ac. Total</i>	RGJC	1,16-2,22	62,37	0,7898	0,124	1,63
<i>pH</i>	RGJC	2,66-4,23	91,51	0,9567	0,0563	3,44
<i>Brix</i>	RGJC	64,75-68,57	82,77	0,9098	0,509	2,41
<i>Baumé</i>	CAR	26,32-38,23	93,1	0,9649	0,728	3,81
<i>Densidad</i>	CAR	1,22734-1,35654	94,56	0,9725	0,00721	4,29
<i>N amoniacal</i>	CAR	0,02-1,4	99,24	0,9962	0,0405	11,5
<i>N total</i>	CAR	0,34-2,32	86,71	0,9315	0,261	2,74
<i>Extracto seco</i>	CAR	46,8-69,3	93,53	0,9672	1,27	3,93
<i>Extracto seco</i>	CAR BS	53,71-73,34	98,61	0,9933	0,445	8,51

TABLA 13. Resumen de las calibraciones por parámetros.

4. CONCLUSIONES.

En general, se obtuvieron calibraciones de buena calidad para los diferentes parámetros en los cuales se han determinado un elevado número de muestras. Por tanto, se contrasta el buen funcionamiento del equipo.

El sistema funciona óptimamente para muestras que son conocidas con un buen sistema de calibración. Toda muestra desconocida, cuyo espectro difiere de los que dispone el sistema, se alejará de los valores reales.

En síntesis, se destaca la obtención de buenas calibraciones para parámetros como los grados Baumé, densidad y los grados Brix para mosto azufrado tinto (MAT). A su vez, buena calibración en los grados Brix del mosto concentrado tinto (RGJC) y nitrógeno amoniacal en el caso de los caramelos catalizados.

A lo expuesto anteriormente, cabría destacar la acidez total en mosto concentrado tinto (RGJC) ya que, debido a su composición química se podría realizar la calibración de manera separada en los dos tipos de mostos concentrados que se analizaron de manera conjunta, es decir, de 65 y de 68 grados Brix. Otra opción sería establecer diferentes rangos de color realizando calibraciones de acidez para muestras con colores bajos y otra para muestras con colores altos.

Por otra parte, se encuentran parámetros con posibilidad de mejora añadiendo más muestras ya que se detecta una buena proyección. Estos serían los grados Baumé, la densidad, el nitrógeno total, el extracto seco en caramelos catalizados y el extracto seco en el caso de los caramelos Burnt Sugar (BS).

Por último, se destaca la mala calibración para el pH en el mosto concentrado tinto (RGJC). Pese a que el número de muestras es elevado, se observa un ajuste limitado y, por tanto, no predice de la manera deseada el parámetro.

En conclusión, pese a ser ajustable, se podría concluir que el equipo funciona como se esperaba y es de gran aplicación dentro del laboratorio de la empresa.

5. BIBLIOGRAFÍA.

- FT-IR Wine Analysis Reference Manual (OPUS). Manual ATR Alpha Bruker (LINLAB Soluciones Integrales de Laboratorio).
- de Fuentes Navarta, M., Ojeda, C. B., & Rojas, F. S. (2008). Aplicación de la espectroscopia del infrarrojo medio en química analítica de procesos. *Bol. Soc. Quím. Méx*, 2(3), 93-103.
- Gutierrez Devia, A., Muñoz Florez, J., Belalcazar Martinez, J., Ibarra Espinosa, D., Caicedo Arana, A., & Caetano, C. (2015). Aplicación de la espectroscopia NIR para la predicción de sólidos solubles en pulpa de guayaba. *Acta Agronómica*, 64(2), 103 – 109
- M. Hernández-Martínez, T. Gallardo-Velázquez, G. Osorio-Revilla, N. Almaraz-Abarca & E. Castañeda-Pérez (2014) Application of MIR-FTIR spectroscopy and chemometrics to the rapid prediction of fish fillet quality, *CyTA - Journal of Food*, 12:4, 369-377, DOI: 10.1080/19476337.2014.889213
- METTLER TOLEDO. www.mt.com visto el 20 de julio de 2019
- Nicolai, B. M.; Beullens, K.; Bobelyn, E.; Peirs, A.; Saeys, W.; Theron, K.; y Lammertyn, J. 2007. Nondestructive measurement of fruit and vegetable quality by means of NIR spectroscopy: a review. *Postharvest Biol. Technol.* 46(2):99 – 118.
- SECNA NATURAL COLORS. www.secna.com