

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE CARTAGENA
ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA
AGRONÓMICA



PROYECTO FIN DE CARRERA
**Análisis del perfil de azúcares en la
autenticación de zumos de frutas**



Directores: M^a Rosario Castellar Rodríguez
Jose M^a Obón de Castro
Autor: Ana Úbeda Gallego
Titulación: Ingeniería Agrónoma
Intensificación: Industrias Agrarias y Alimentarias

Diciembre 2012

ABREVIATURAS

- FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations
- OMS: Organización Mundial de la Salud
- IFU: Federación Internacional de Productores de Zumos de Frutas
- AIJN: Asociación de la Industria de Zumos y Néctares de Frutas y Vegetales de la Unión Europea
- ASOZUMOS: Asociación Española de Fabricantes de Zumos
- AEAZN: Asociación Española para el Autocontrol de Zumos y Néctares
- NFC: No proviene de concentrado
- HPLC-PDA-MS:
- IFU: Federación Internacional de productores de zumos de frutas
- AOAC: Revista de la Asociación de Químicos Analíticos Oficiales
- HPLC: Cromatografía Líquida de Alta Resolución
- CG: Cromatografía gaseosa
- IR: Índice de refracción
- ELSD: Evaporativo Light Scattering Detector
- HPAEC-PAD: Cromatografía de intercambio iónico de alta eficacia con detección amperométrica de pulsos.

Análisis del perfil de azúcares en la autenticación de zumos de frutas

Índice

1. Introducción	2
1.1. Los zumos de frutas	2
1.1.1. Legislación y tipos de zumos	2
1.1.2. Comercialización de zumos de frutas	5
1.1.3. Frutas de los zumos mayoritariamente consumidos	15
1.1.4. Beneficios de los zumos de frutas	15
1.2. Azúcares en las frutas	17
1.2.1. Azúcares de la naranja y zumo de naranja	22
1.2.2. Azúcares de la manzana y zumo de manzana	24
1.2.3. Azúcares de la piña y zumo de piña	25
1.2.4. Jarabes de glucosa y azúcares invertidos	26
1.3. Control de calidad y autenticación de los zumos de frutas	29
1.3.1. Análisis de azúcares	33
2. Objetivos	50
3. Materiales y métodos	52
3.1. Materiales de análisis	52
3.1.1. Azúcares	52
3.1.2. Zumos	53
3.1.3. Sustancias químicas	55
3.2. Métodos	56
3.2.1. Determinación de pH	56
3.2.2. Determinación de sólidos solubles totales (°Brix)	57

Análisis del perfil de azúcares en la autenticación de zumos de frutas

3.2.3. Método de análisis (HPAEC-PAD)	57
3.2.4. Determinación de viscosidad	58
3.2.5. Determinación de la densidad	60
3.2.6. Determinación de la acidez valorable	61
4. Resultados y discusión	64
4.1. Selección y puesta a punto de un método de análisis de perfiles de azúcares	64
4.2. Análisis de jarabes de glucosa y azúcares invertidos	65
4.3. Perfiles de azúcares de zumos concentrados	74
4.4. Análisis del perfil de azúcares en zumos naturales	77
4.5. Análisis de zumos reconstituidos	80
4.6. Análisis del perfil de azúcares en zumos comerciales	92
4.7. Análisis y caracterización de los zumos comerciales	105
5. Conclusiones	118
6. Bibliografía	120

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE CARTAGENA
ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA
AGRONÓMICA



PROYECTO FIN DE CARRERA
**Análisis del perfil de azúcares en la
autenticación de zumos de frutas**

Introducción



1. INTRODUCCIÓN

1.1. LOS ZUMOS DE FRUTAS

Los **zumos de frutas** son aquellas sustancias líquidas que se extraen de las frutas, normalmente mediante un proceso físico (presión o exprimido de un fruto). A nivel comercial nos podemos encontrar una gran diversidad de tipos de zumos ya que podemos ver: zumos naturales, zumos preparados a partir de concentrado y zumos refrigerados, además de encontrar también una gran variedad respecto a las frutas de las que proceden (naranja, manzana, piña, melocotón, etc.). Es un producto con un alto interés económico ya que es muy consumido por todo el mundo porque tiene un elevado valor nutritivo y es rico en vitaminas y otros compuestos saludables.

1.1.1. Legislación y tipos de zumos

La FAO y la OMS crearon en 1962 un Código Alimentario (*Codex Alimentarius*) para facilitar el comercio internacional de alimentos y garantizar a los consumidores su calidad, seguridad e inocuidad. El código, ampliamente aceptado y adoptado, se ocupa de la protección del consumidor así como de la producción y comercio de los alimentos a escala mundial, nacional, regional y local. Uno de sus conceptos básicos es: *“Un alimento para ser nutritivo debe ser inocuo”*.

Las ventajas de su aplicación son las siguientes:

- Ayuda a que se cumpla el derecho fundamental de tener acceso a alimentos de buena calidad, inocuos y nutritivos.
- Elimina barreras no arancelarias y artificiales al comercio, lo que permite el acceso a los mercados a quienes producen, elaboran y comercializan los alimentos.
- Protege la salud de los consumidores.
- Hace que las reglas sean claras para todos, con lo que: facilita la comercialización y el transporte de los alimentos, establece prácticas equitativas en el comercio de los alimentos y permite la normalización de conceptos y puntos de calidad.

Análisis del perfil de azúcares en la autenticación de zumos de frutas

Introducción

Dentro de este Código Alimentario hay un código específico para Zumos (CODEX STAN 247-2005) que, conforme a las disposiciones de la Comisión del Codex Alimentarius, define lo que son los zumos y los métodos analíticos a utilizar para asegurar la calidad y autenticidad de los zumos (www.codexalimentarius.org).

La legislación de zumos vigente en la actualidad en la Unión Europea y en España está regulada por:

Disposición Comunitaria de directa aplicación:

- **Directiva 2001/112/CE** objeto de transposición del Consejo, de 20 de diciembre, relativa a los zumos de frutas y otros productos similares destinados a la alimentación humana (Diario Oficial de la Unión Europea, L10 del 12.01.02).
- **Directiva 2009/106/CE** de la Comisión, de 14 de agosto, por la que modifica la Directiva 2001/112/CE del Consejo relativa a los zumos de frutas y otros productos similares destinados a la alimentación humana (Diario Oficial de la Unión Europea, L212 del 15.08.09).

Disposiciones Nacionales:

- **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 (B.O.E. nº 184 del 02.08.03).
- **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 (B.O.E. nº 294 del 08.12.07).
- **Real Decreto 462/2011**, de 1 de abril, por el que se modifica el Real Decreto 1050/2033, 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 (B.O.E. nº 85 de 09.04.11).

Análisis del perfil de azúcares en la autenticación de zumos de frutas

Introducción

Según el Código Alimentario de Zumos (CODEX STAN 247-2005) y el Real Decreto 1050/2003, se pueden definir los **tipos de zumos** que podemos encontrar en el mercado como:

- **Zumo de fruta:** Líquido sin fermentar, pero fermentable, que se obtiene de la parte comestible de frutas en buen estado, debidamente maduras y frescas o frutas que se han mantenido en buen estado por procedimientos adecuados, inclusive por tratamientos de superficie aplicados después de la cosecha.
- **Zumo de concentrado de fruta:** producto obtenido a partir de zumo de frutas de una o varias especies, por eliminación física de una parte determinada del agua. Cuando el producto esté destinado al consumo directo, dicha eliminación será de al menos un 50%.
- **Zumo de fruta a base de concentrado:** 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.
- **Zumos de fruta deshidratado o en polvo:** producto obtenido a partir de zumo de frutas, de una o varias especies, por eliminación física de la totalidad de agua.
- **Néctar de fruta:** 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.

Análisis del perfil de azúcares en la autenticación de zumos de frutas

Introducción

- **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. Podrá contener componentes restablecidos, de sustancias aromáticas y aromatizantes volátiles; y podrá añadirse pulpa y celdillas obtenidas por procedimientos físicos adecuados del mismo tipo de fruta.
- **Puré concentrado de fruta utilizado en la elaboración de zumos y néctares de frutas:** producto obtenido mediante la eliminación física de agua del puré de fruta en una cantidad suficiente para elevar el nivel de grados Brix en un 50% más que el valor Brix establecido para el zumo reconstituido de la misma fruta. Podrá contener componentes restablecidos, de sustancias aromáticas y aromatizantes volátiles, elementos todos ellos que deberán obtenerse por procedimientos físicos adecuados y proceder del mismo tipo de fruta.

La elaboración de los zumos podrá realizarse junto con sus pepitas, semillas y pieles, que normalmente no se incorporan al zumo, aunque serán aceptables algunas partes o componentes de pepitas, semillas y pieles que no puedan eliminarse mediante las buenas prácticas de fabricación. Además, queda terminantemente prohibida la adición de **colorantes alimentarios** en la industria de zumos para enmascarar defectos del producto o para dar una sensación de calidad que éste no posee.

1.1.2. Comercialización de zumos de fruta

En Europa los consumidores prefieren tomar el zumo sin que esté concentrado para beberlo tal y como lo compran, sin embargo en E.E.U.U. los consumidores prefieren el zumo concentrado y preparar ellos el zumo añadiendo el agua correspondiente.

Los cambios sociales en el consumo de alimentos han cambiado, el consumidor tiende a ocupar menos tiempo en la realización de las comidas, esto ha repercutido también en un aumento del consumo de zumo preparado.

Análisis del perfil de azúcares en la autenticación de zumos de frutas

Introducción

El consumidor puede encontrar en el mercado de los zumos de frutas diversos formatos como: zumos refrigerados o no, zumos obtenidos directamente de la fruta (exprimidos 100%), zumos reconstituidos a partir de concentrados, mezclas de diversas frutas, néctares, refrescos sin gas, etc.

Existen diversas asociaciones en la industria de zumos que regulan la calidad y especificaciones de los zumos y bebidas de frutas. A nivel internacional es la IFU (Federación Internacional de Productores de Zumos de Frutas), a nivel europeo es la AIJN (Asociación de la Industria de Zumos y Néctares de Frutas y Vegetales de la Unión Europea) y en España es, desde 1978, ASOZUMOS (Asociación Española de Fabricantes de Zumos) la que integra la mayor parte de las empresas del sector, con una representatividad sectorial estimada en más del 80% de la producción nacional de zumos y que engloba diversos modelos de negocio como transformadores de fruta, envasadores y comercializadores tanto de marcas propias como de marcas blancas. Además, de acuerdo con el modelo vigente en la mayoría de los países europeos, España cuenta con la Asociación Española para el Autocontrol de Zumos y Néctares (AEAZN) que se ocupa de fomentar la libre y leal competencia entre las empresas del sector mediante el control de la autenticidad y calidad de sus productos y lucha contra el fraude y la adulteración.

Comercialización a nivel mundial

A nivel global, los zumos de frutas y el mercado de néctares registró una disminución marginal en el año 2011, influenciada por una fuerte caída de la demanda en América del Norte y en el este de Europa.

La Tabla 1.1 recoge los datos de consumo de zumos de frutas y néctares de los mayores mercados en 2011, según la AIJN. El consumo total de zumos de frutas y néctares de los mayores mercados en 2011 fue de 34.719 millones de litros, de los cuales, la UE 27 consume 10.771 millones de litros, el oeste de Europa 9.831 millones de litros y el norte de América 9.755 millones de litros (www.aijn.org).

Análisis del perfil de azúcares en la autenticación de zumos de frutas

Introducción

Tabla 1.1. Consumo de zumo y néctar de los mayores mercados en 2011
(www.aijn.org).

Región	Millones de litros
Este de Europa	5.568
Latino América	3.404
Norte América	9.755
Oeste de Europa	9.831
Asia pacífica	6.815
África y Oriente medio	3.576
Total	23.948
UE 27	10.771

Los 10 principales países consumidores a nivel mundial de zumos y néctares son: Estados Unidos, Alemania, China, Rusia, Francia, Japón, Reino Unido, España, Canadá y Méjico, y suponen un 62% del consumo total mundial.

Comercialización en Europa

El consumo de zumos de frutas y néctares en Europa fue de 10,7 millones de litros en el año 2011 como se muestra en la Tabla 1.2. Si se incluyen Turquía, Noruega y Suiza las ventas aumentan a 11,8 millones de litros, impulsadas por el aumento en el consumo de zumos y néctares sobre todo en Turquía.

El aumento de precio en las materias primas, los costes logísticos y el aumento de los precios de concentrado condujo a un aumento de los precios al por menor, llevando a muchos consumidores a racionalizar sus decisiones de compra.

Análisis del perfil de azúcares en la autenticación de zumos de frutas

Introducción

En ciertos países de la UE como Francia y el Reino Unido hay una tendencia a la calidad. En 2011 se sufrió un cambio en la forma de compra de los consumidores en estos dos países ya que el consumidor miró más el producto de primera calidad y el zumo no proveniente de concentrado. Parece que hay una demanda creciente de la calidad sobre la cantidad y los consumidores están preparados a pagar los beneficios de un zumo de alta calidad.

En la Tabla 1.2 podemos ver los cinco principales países consumidores de zumos y néctares de la Unión Europea durante 2011, éstos países fueron: Alemania con un consumo de 2.733 millones de litros, líder absoluto del total consumido en la Unión Europea; Francia con un consumo de 1.713 millones de litros, Reino Unido con 1.369 millones de litros, España con 1.068 millones de litros e Italia con 0.808 millones de litros.

Tabla 1.2. Consumo zumos y néctares de los principales países de la UE en 2011(www.aijn.org).

País	Millones de litros
Alemania	2.733
Francia	1.713
Reino Unido	1.369
España	1.068
Italia	0.808
Resto de países	3.079
Total	10.771

Con respecto al consumo per cápita podemos ver en la Tabla 1.3 como destaca Alemania como mayor consumidor con 38,9 litros por persona, seguido de Finlandia con 31,4 litros por persona; Austria con 28,5 litros por persona; Países bajos con 27,9 litros por persona y Suecia con 27,5 litros por persona.

Análisis del perfil de azúcares en la autentificación de zumos de frutas

Introducción

Tabla 1.3. Consumo per cápita de zumos y néctares de los principales países de la UE en 2011(www.aijn.org).

País	Población (millón)	Litros por persona
Alemania	81,5	34
Finlandia	5,3	31,4
Austria	8,4	28,5
Países bajos	16,7	27,9
Suecia	9,3	27,5

La Figura 1.1 muestra la evolución desde 1989 del consumo de zumos y néctares en la Unión Europea y la previsión estimada hasta 2017. En la Figura 1.1 vemos un crecimiento del consumo hasta 2006. A partir de 2006 empezó a disminuir ligeramente el consumo hasta 2012 y, de 2012 a 2017 se prevé un mantenimiento del consumo.

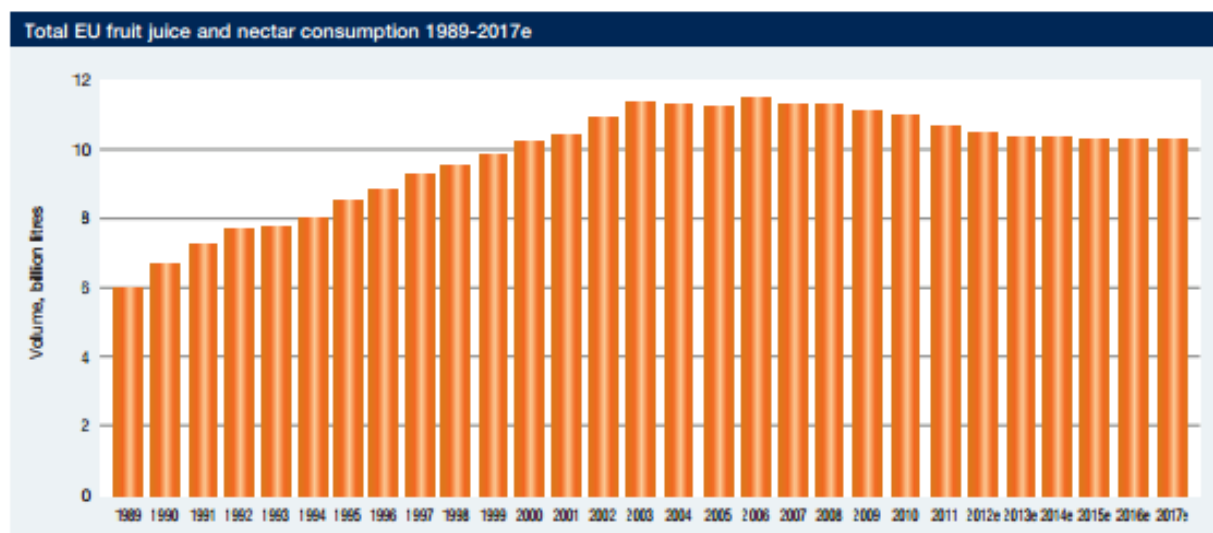


Figura 1.1. Evolución del consumo de zumos y néctares en la Unión Europea (www.aijn.org).

Entre los zumos de frutas comerciales el zumo de naranja es el más consumido por lo que su importancia a nivel económico es muy destacada. Entre los países productores destaca Brasil ya que suministra el 80% ó 90% de la demanda de zumo de naranja en la UE.

Análisis del perfil de azúcares en la autenticación de zumos de frutas

Introducción

Normalmente los zumos importados a la UE provienen de concentrado, a los cuales se les disminuye el volumen mediante procesos físicos eliminándole el agua y así se facilita el transporte, los costes son menores y preservan mejor sus propiedades. Una vez que el zumo concentrado llega a la industria ésta se encarga de reconstituir el zumo añadiéndole el agua que ha sido eliminada anteriormente.

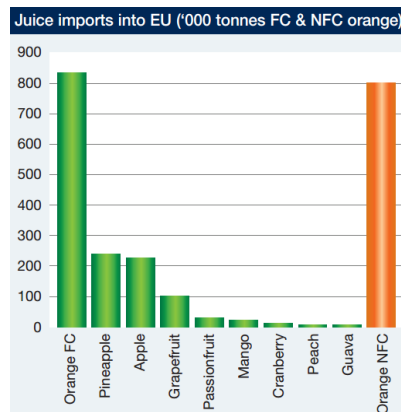


Figura 1.2. Importaciones a la UE de zumos de fruta concentrados (FC) y no concentrados (NFC) (www.aijn.org).

Como se observa en la Figura 1.2 y como ha hemos comentado anteriormente en la UE en general las importaciones de zumos de frutas son en forma de zumos concentrados. Tan solo en el caso de la naranja se importa zumo no concentrado. El zumo más importando con una gran diferencia es el zumo de naranja proveniente de concentrado y de no concentrado.

En la Figura 1.3 se pueden ver las cantidades de los diferentes zumos de frutas que se importan a España y de qué países provienen. Todos los zumos provienen de concentrado menos alguno de naranja que se refleja en el dibujo como NFC (no proviene de concentrado).

Análisis del perfil de azúcares en la autenticación de zumos de frutas

Introducción

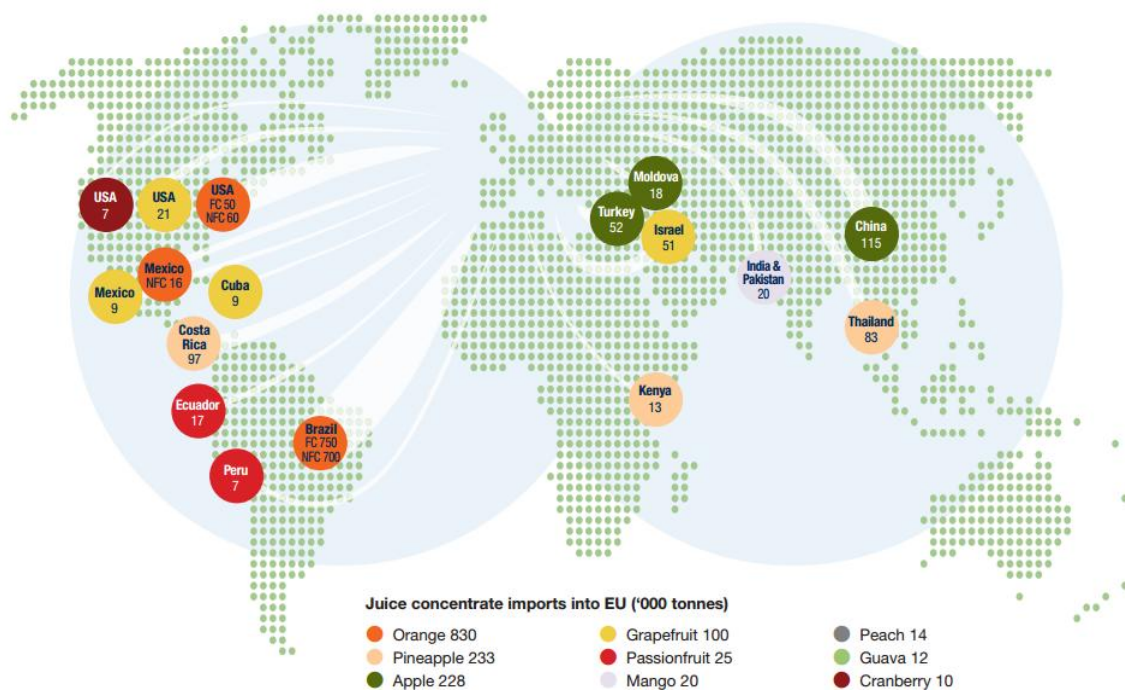


Figura 1.3. Flujos de importación de diferentes zumos de frutas (toneladas) (www.aijn.org).

El principal país exportador (Figura 1.4) de zumo de naranja a la UE es Brasil con el 80% ó 90%, seguido de Estados Unidos con el 7% y por último Méjico e Israel con el 1%.

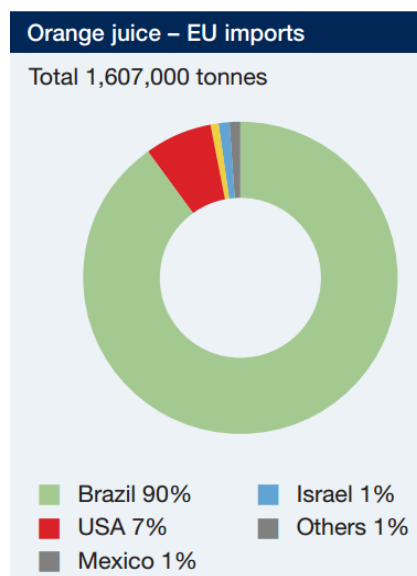


Figura 1.4. Países exportadores de zumo de naranja a la UE (www.aijn.org).

Análisis del perfil de azúcares en la autenticación de zumos de frutas

Introducción

En el caso del zumo de manzana el país que mayor cantidad exporta a la UE (Figura 1.5) es china con el 50% del volumen total seguido de Turquía con el 23%.

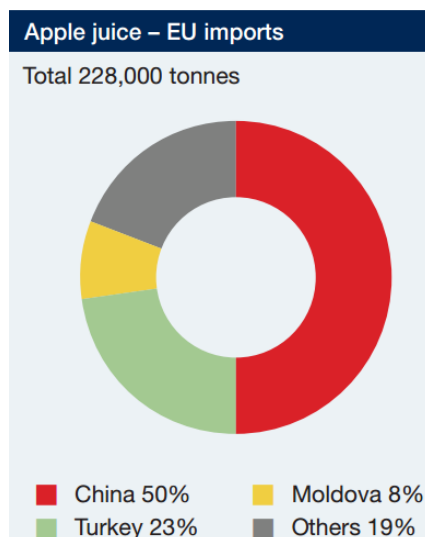


Figura 1.5. Países exportadores de zumo de manzana a la UE (www.aijn.org).

Respecto a la piña (Figura 1.6) el principal país exportador es Costa Rica con el 42% del volumen total, le sigue Tailandia con el 36% y por último está Kenia con un 5%.

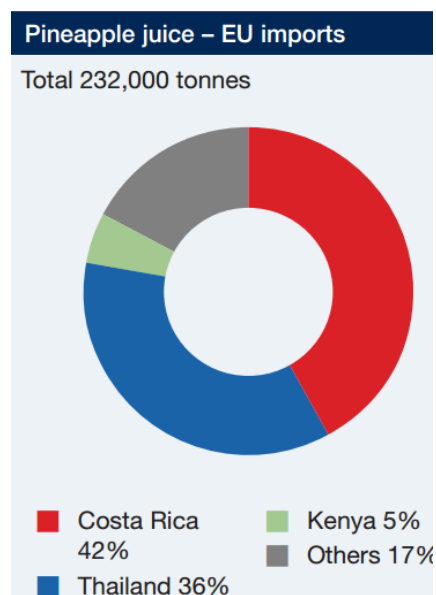


Figura 1.6. Países exportadores de zumo de piña a la UE (www.aijn.org).

Comercialización en España

En los últimos años se ha experimentado un descenso en el consumo de zumo debido a la gravedad de la situación económica que España está viviendo. Sobre todo ha afectado al consumo de zumos refrigerados y al consumo de zumos en locales. Se ha producido un aumento del consumo de zumos recién exprimidos y estos consumidores renuncian el zumo en vasado.

El zumo de naranja es el más consumido en España y es el más segmentado en términos de: no proviene de concentrado/proviene de concentrado, con pulpa/sin pulpa o refrigerado/no refrigerado.

En la Tabla 1.4 se muestra el volumen de zumos de frutas y néctares consumidos en España entre 2007 y 2011, el volumen consumido de zumo de frutas fue ligeramente inferior al de años anteriores suponiendo una disminución del 6% y el volumen consumido de néctares fue ligeramente superior al de años anteriores con un aumento del 0,3% respecto a la campaña de 2010. La Tabla 1.4 muestra además la procedencia y el modo de conservación del producto comercial.

Análisis del perfil de azúcares en la autenticación de zumos de frutas

Introducción

Tabla 1.4. Evolución del consumo de zumos de frutas y néctares en España (www.aijn.org).

ZUMO DE FRUTAS (100%)

Volumen, millones de litros	2007	2008	2009	2010	2011	%cambio
Total Zumo de frutas	534	525	529	512	481	-6,0%
Ambiente:	476	468	474	458	438	-4,5%
De concentrado	466	449	431	399	372	-6,9%
No de concentrado (exprimido)	10	19	43	59	66	12,3%
Refrigerado:	59	57	55	53	43	-19,8%
De concentrado	32	27	31	29	19	-34,2%
No de concentrado (exprimido)	27	30	24	24	23	-2,1%

NÉCTARES (25-99% DE ZUMO CONTENIDO)

Volumen, millones de litros	2007	2008	2009	2010	2011	%cambio
Total Zumo de frutas	588	585	580	585	587	0,3%
Ambiente	584	581	576	583	586	0,5%
Refrigerado	4	4	3	3	2	-40,5%

Respecto a los zumos de frutas conservados a temperatura ambiente, destaca la disminución del consumo de zumos procedentes de concentrado y el aumento del consumo de los zumos exprimidos, aunque el consumo de este todavía sea bastante inferior al de los zumos provenientes de concentrado.

En cuanto a los néctares, la tendencia mayoritaria es el consumo de los almacenados a temperatura ambiente frente a los refrigerados.

1.1.3. Frutas de los zumos mayoritariamente consumidos

Los sabores más consumidos en la Unión Europea durante el año 2009 fueron naranja (33,8%), manzana (14,9%), mezclas (11,3%), multivitaminas (6,6%), piña (4,7%) y otros (28,7%).

Respecto a los sabores más consumidos en España, destacan la naranja (26,1%), piña (24,6%), melocotón (23,4%) y uva (7,9%). Estos sabores, a excepción de la naranja, son distintos a los mayoritariamente consumidos en el resto de Europa debido al excedente que tiene nuestro país en el cultivo de uva y melocotón que son sabores poco consumidos en otros países. El elevado consumo de piña y melocotón se debe a su dulzor, que atrae a los más pequeños, a diferencia del sabor de la naranja que es consumido principalmente por adultos.

1.1.4. Beneficios de los zumos de frutas

Las plantas forman parte de la dieta humana y contienen componentes bioactivos que pueden ejercer efectos fisiológicos más allá de la nutrición promoviendo la salud humana y siendo beneficiosos. Estudios epidemiológicos demuestran que el consumo regular de frutas y vegetales está asociado con la disminución del riesgo de padecer enfermedades crónicas como el cáncer, problemas cardiovasculares, Alzheimer, derrame cerebral, cataratas o el empeoramiento funcional asociado a la edad (Schieber *et al.* 2001; Stintzing & Carle, 2004). Los zumos son una fuente importante de vitaminas y minerales y con su consumo podemos obtener diversos nutrientes y compuestos funcionales necesarios para nuestro organismo.

Una estrategia nutricional surgida hace pocos años es la denominada **zumoterapia**. Básicamente se trata de consumir las frutas en forma de zumo buscando la máxima asimilación o disponibilidad de la gran cantidad de vitaminas y minerales que aportan las frutas y verduras.

Análisis del perfil de azúcares en la autenticación de zumos de frutas

Introducción

Los componentes que nos aporta el consumo de frutas en general y que son beneficiosos para la salud de los consumidores, se pueden clasificar en:

- Agua → en general todas las frutas tienen un alto porcentaje en torno al 90%.
- Vitaminas → las frutas son ricas en vitaminas C, ácido fólico, vitamina B6...
- Sales minerales → potasio, magnesio y calcio.
- Hidratos de carbono → glucosa, fructosa, sacarosa, sorbitol.
- Fibra → mejora el tránsito intestinal.
- Ácidos orgánicos → ácido cítrico (acción desinfectante), málico, oxálico y salicílico (acción analgésica, anticoagulante y antiinflamatoria).
- Polifenoles → efecto antioxidante.

Los polifenoles tienen un papel beneficioso para nuestra salud debido al efecto antioxidante que proporcionan, que previene el envejecimiento celular. Las frutas y los vegetales constituyen una de las principales fuentes de compuestos fenólicos en la dieta. La mayoría de estos compuestos permanecen en los productos elaborados a base de frutas como por ejemplo zumos o mermeladas (García-Alonso, 2005).

Además, los zumos de fruta tienen también un efecto nutritivo y energético debido a la presencia de los azúcares: glucosa, fructosa y sacarosa. En los zumos de fruta 100% generalmente no se añaden azúcares, en otros preparados de zumos y néctares sí está permitida la adición de azúcares.

1.2. AZÚCARES EN LAS FRUTAS.

En todas las frutas y zumos de frutas nos vamos a encontrar principalmente tres azúcares: fructosa, glucosa y sacarosa. Los azúcares son sólidos a temperatura ambiente, incoloros, cristalinos, dulces y solubles en agua. Glucosa y fructosa son monosacáridos mientras que la sacarosa es un disacárido formado por glucosa y fructosa, cuya hidrólisis rinde estos dos monosacáridos.

La **fructosa** se obtiene principalmente de las frutas, razón por la que se le conoce como “azúcar de la fruta”. Es muy abundante en la uva, y también se puede encontrar en algunas verduras y en la miel. Es el monómero componente de la inulina, un polisacárido de reserva de algunos vegetales que se usa a nivel industrial como fuente de fructosa.

Éste monosacárido tiene la misma fórmula empírica que la glucosa pero con diferente estructura. Es una cetohexosa ya que el grupo carbonilo no se encuentra en el extremo de la molécula, sino en el carbono 2. Su fórmula química según la representación de Fischer se muestra en la Figura 1.7.

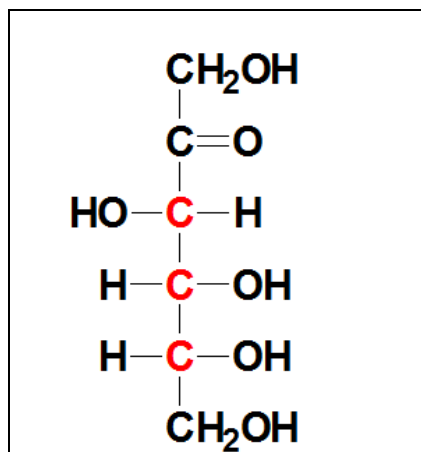


Figura 1.7. Fórmula de Fischer de D-fructosa

Esta molécula tiene tres carbonos asimétricos y se cicla formando un hemiacetal intra molecular entre el carbono dos y el carbono cinco, adquiriendo la configuración de furanosa según las proyecciones de Haworth. La Figura 1.8 muestra esta estructura de la D-fructosa como D-fructofuranosa.

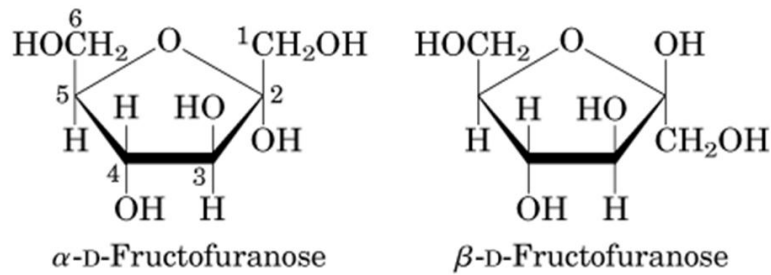


Figura 1.8. Fórmulas de proyección de Haworth de α -D-Fructofuranosa y β -D-Fructofuranosa

La fructosa se disuelve en agua y es el azúcar con mayor poder endulzante, superando a la sacarosa, por lo que, se utiliza como endulzante natural, ya que aporta menos calorías que otros azúcares como la glucosa ó la sacarosa para obtener el mismo dulzor.

La fructosa se usa desde los años setenta en Estados Unidos y en la Unión Europea para endulzar refrescos. Actualmente está presente en diferentes cantidades en una amplia variedad de alimentos, y se ha convertido en uno de los endulzantes más utilizados por la industria alimentaria. Se le puede encontrar en productos de repostería, alimentos procesados y bebidas refrescantes azucaradas.

Todas las frutas naturales tienen cierta cantidad de fructosa.

La **glucosa** es el hidrato de carbono más elemental y esencial para la vida, es un monosacárido con fórmula $C_6H_{12}O_6$ la misma que la fructosa pero con diferente posición relativa de los grupos alcohol y carbonilo. Es una aldohexosa ya que el grupo carbonilo está en el extremo de la molécula. Es una forma de azúcar que se encuentra libre en las frutas y en la miel. En disolución acuosa, la glucosa forma un hemiacetal intramolecular adquiriendo la configuración de un heterociclo llamado piranosa según la proyección de Haworth. La Figura 1.9 muestra las fórmulas de Fisher y Haworth de la D-glucosa. La glucosa es un azúcar reductor al igual que la fructosa.

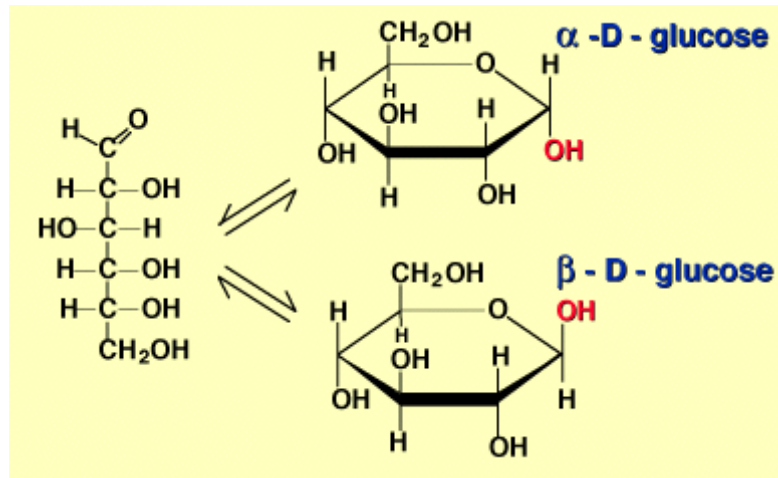


Figura 1.9. Fórmulas de Fisher y Haworth de la D-glucosa

La glucosa es el producto de la fotosíntesis, ruta biosintética de organismos autótrofos como los vegetales y algas. En la fotosíntesis se produce glucosa a partir de dióxido de carbono con la energía de la luz del sol. La glucosa se transforma en sacarosa en los vegetales y en almidón en cereales y hortalizas, o en fructosa en las frutas y la miel.

La glucosa es el carbohidrato más abundante de la naturaleza, en la sangre se encuentra en concentraciones de un gramo por litro. Al polimerizarse da lugar a polisacáridos con función energética (almidón en vegetales y glucógeno en animales) o con función estructural, como la celulosa de las plantas. Es la principal fuente de energía celular y es también fuente de carbono en organismos heterótrofos.

Todas las frutas naturales tienen cierta cantidad de glucosa.

La **sacarosa** es un disacárido compuesto de glucosa y fructosa, es el llamado azúcar de mesa, se sintetiza en las plantas, pero no en animales superiores, a diferencia de glucosa y fructosa es un azúcar no reductor, puesto que los carbonos anoméricos de sus dos unidades monosacáridos constituyentes se hallan unidos entre sí, covalentemente mediante un enlace O-glucosídico. Está formado por alfa-glucopiranososa y beta-fructofuranosa. Su nombre químico es:

Beta-D-fructofuranosil-(2->1)-alfa-D-glucopiranosido

Y su fórmula química es: (C₁₂H₂₂O₁₁)

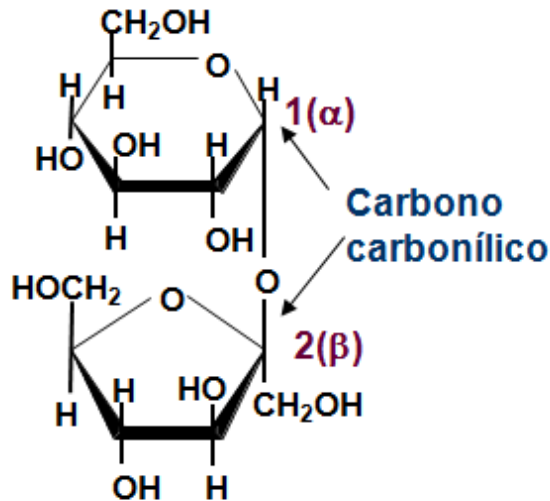


Figura 1.10. Fórmula Haworth de la sacarosa.

La enzima encargada de hidrolizarla es la sacarasa, también conocida como invertasa, la sacarosa hidrolizada es llamada también *azúcar invertido*. El azúcar de mesa es el edulcorante más utilizado para endulzar los alimentos.

El **sorbitol** es un polialcohol o alcohol polihídrico de azúcar. Industrialmente el sorbitol, cuya fórmula empírica es C₆H₁₄O₆, se obtiene por reducción del monosacárido más común, la glucosa.

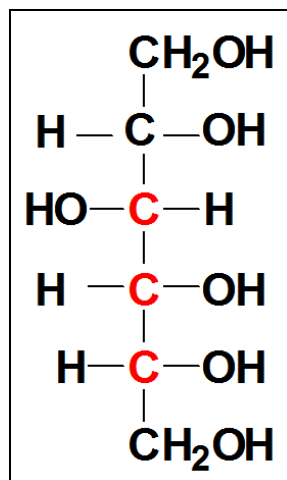


Figura 1.11. Fórmula de Fischer del sorbitol

Análisis del perfil de azúcares en la autenticación de zumos de frutas

Introducción

En la naturaleza el sorbitol se encuentra en cantidades apreciables en las algas rojas y, junto a la fructosa, la glucosa y la sacarosa, en frutos como las peras, las manzanas, las cerezas y los melocotones (van Gorsel *et al.*, 1992).

Es un sólido higroscópico que se utiliza en la industria como humectante para mantener diversos productos con un grado de humedad apropiado, se utiliza en la elaboración de alimentos, fármacos y productos químicos. También se usa como emulsionante en la fabricación de pasteles y dulces para impedir que se separen la fase acuosa y la fase grasa en estos alimentos; el sabor dulce relativo de la sacarosa-sorbitol es de 100-60 por lo tanto necesitaremos una cantidad mayor de sorbitol para obtener el mismo sabor dulce que el azúcar de mesa.

El sorbitol se emplea como edulcorante en los alimentos dietéticos ya que no se digiere. Es el edulcorante que contienen generalmente los chicles y caramelos “sin azúcar”.

El **inositol** no es un azúcar es un alcohol cíclico, ciclohexanohexol, relacionado químicamente con la glucosa.

De los 9 isómeros del inositol solo el **mioinositol** (inositol-1,2,5-trifosfato) tiene importancia en el metabolismo de los animales y plantas. En los vegetales se encuentra como ácido fítico y en los tejidos animales como constituyente de los fosfolípidos de las membranas celulares.

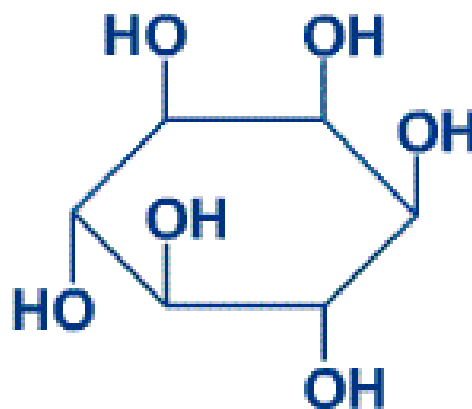


Figura 1.12. Fórmula del inositol.

Características:

- El mioinositol se admite como importante nutriente al considerarlo segundo mensajero de los estímulos hormonales mediados por receptores y por su función en la movilización del calcio intracelular.
- El contenido de mioinositol de los tejidos procede de la dieta y del sintetizado endógenamente.
- No se ha demostrado que sea esencial para los humanos, pero algunos animales necesitan que se aporte en sus dietas.
- Su deficiencia da lugar a alteraciones en el metabolismo de los lípidos.

El mioinositol se encuentra en la naranja. Debido a esto, se han realizado estudios para determinar la composición de hidratos de carbono en zumo de naranja y así proporcionar un método para evaluar la calidad del zumo de naranja, especialmente el contenido de mioinositol y la relación mioinositol/fructosa. Estos índices proporcionan información sobre la calidad y la autenticidad en zumos de naranja.

A continuación, vamos a hablar sobre los azúcares que contienen los zumos de naranja, manzana y piña. El motivo de elegir estos tres zumos de frutas ha sido porque son los más consumidos en la actualidad.

1.2.1. Azúcares de la naranja y zumo de naranja

En el zumo de naranja, los componentes más abundantes después del agua son los azúcares y el ácido cítrico, que suman casi el total de los sólidos solubles. En la maduración, el contenido en azúcares aumenta y el de ácidos disminuye. Se alcanza una relación azúcares-ácido que hace la fruta sabrosa y apetecible.

Uno de los factores primarios de calidad, en los zumos de naranja, es el contenido en sólidos disueltos, que varía según la variedad, el grado de madurez y las técnicas de cultivo.

Análisis del perfil de azúcares en la autenticación de zumos de frutas

Introducción



Los sólidos solubles del zumo de naranja están formados, fundamentalmente, por los azúcares reductores y no reductores y por los ácidos.

Los principales azúcares, en los zumos de naranja son: sacarosa, glucosa y fructosa, que suman alrededor del 75% de los sólidos solubles totales, estando frecuentemente equilibrados los reductores y la sacarosa (no reductor). En menor proporción que los anteriores nos encontramos el mioinositol (inositol-1,2,5-trifosfato), que es uno de los isómeros del inositol. Como ya hemos comentado en el apartado anterior el inositol es un alcohol cíclico, ciclohexanohexol, relacionado químicamente con la glucosa.

Durante el tratamiento y almacenamiento de los zumos se va hidrolizando la sacarosa en azúcares reductores: glucosa y fructosa. Cuando la sacarosa se hidroliza el sabor dulce aumenta porque los monosacáridos (glucosa y fructosa) libres aportan más dulzor que la sacarosa.

Los componentes del zumo de naranja son los que se muestran en la siguiente Tabla 1.5:

Tabla 1.5. Componentes del zumo de naranja

Componentes	Cantidad (g/100g zumo)
Agua	87,4
Azúcares reductores (glucosa y fructosa)	5,2
Sacarosa	4,7
Lípidos	0,33

1.2.2. Azúcares de la manzana y zumo de manzana

Los azúcares que nos encontramos en la manzana son fructosa, glucosa, sacarosa y sorbitol.

Entre el 12,6% y 15 % de los componentes de la manzana son hidratos de carbono en forma de azúcares. Se trata en su mayor parte de fructosa y en menor proporción, de glucosa y sacarosa.



La Tabla 1.6 muestra una lista de la cantidad de hidratos de carbono simples de la manzana:

Tabla 1.6. Azúcares simples del zumo de manzana

Nutriente	Cantidad (g/100g zumo)
Agua	84
Fructosa	5,74
Glucosa	2,03
Sacarosa	2,55
Lípidos	0,4

La manzana tiene unas propiedades nutritivas muy importantes ya que es una de las frutas más completas y enriquecedoras en la dieta. Como vemos en la Tabla 1.6, un 84% de su composición es agua, por lo que resulta muy hidratante y refrescante. Con respecto a los azúcares, la mayor parte es fructosa y en menor proporción, glucosa y sacarosa, de rápida asimilación en el

Análisis del perfil de azúcares en la autenticación de zumos de frutas

Introducción

organismo. Es fuente discreta de vitamina E o tocoferol y aporta una escasa cantidad de vitamina C. Es rica en fibra, que mejora el tránsito intestinal.

Las extraordinarias propiedades dietéticas que se le atribuyen a esta fruta se deben en gran medida a los elementos fitoquímicos que contiene, entre ellos, flavonoides y quercitina, con propiedades antioxidantes.

1.2.3. Azúcares de la piña y zumo de piña

La Tabla 1.7 muestra una lista de la cantidad de hidratos de carbono simples de la piña y del zumo de piña:

Tabla 1.7. Azúcares simples del zumo de piña

Nutriente	Cantidad (g/100g zumo)
Agua	86,5
Azúcar	9,71
Fructosa	2,59
Glucosa	2,60
Sacarosa	4,51
Lípidos	0,10

Como podemos ver tiene una mayor cantidad de sacarosa, respecto a los azúcares simples. Los azúcares simples (glucosa y fructosa) se presentan más o menos en la misma cantidad.

El principal componente de la piña es el agua, que constituye aproximadamente el 86,5% de su peso. El nutriente principal de la piña son los hidratos de carbono simples, que suponen aproximadamente el 11% de su peso, mientras que las proteínas y las grasas apenas están presentes en esta fruta.

En cuanto al contenido de vitaminas cabe destacar la presencia de vitamina C y en menor cantidad contiene vitamina B1 y B6.

1.2.4. Jarabes de glucosa y azúcares invertidos.

Los ácidos orgánicos y azúcares presentes en los zumos de frutas están involucrados en características muy importantes, tales como el sabor, el aroma, la madurez y la calidad, y son indicativos de las condiciones de almacenamiento. La determinación de azúcares en zumos de frutas sirve como indicadores de la autenticidad y/o de la adición de azúcares no declarados en estos alimentos.

Con frecuencia a los zumos de frutas se le adicionan edulcorantes comerciales lo que representa un problema económico y regulatorio. Las formas más comunes de adulteración incluyen una dilución simple y mezcla de zumos de bajo coste con otros más caros. En otras ocasiones los zumos se adulteran con la adición de agua y azúcares exógenos, sobre todo cuando se preparan zumos a base de concentrado o néctares. La fuente de edulcorante para adicionar a los zumos de frutas puede ser de otros zumos o azúcares derivados de zumos de frutas o vegetales. Por lo tanto, el conocimiento cualitativo y cuantitativo de la distribución de los azúcares en zumos de frutas como: los azúcares de menor importancia, los enantiómeros menos frecuentes de azúcares, la proporción de azúcares mayores o huella dactilar del azúcar; se utilizan para la determinación del origen y de autenticidad en los productos comerciales de zumos de frutas.

Los azúcares añadidos a zumos generalmente son sacarosa, jarabe de glucosa y azúcar invertido. El jarabe de glucosa procede de almidón hidrolizado y el azúcar invertido de la hidrólisis de sacarosa. La sacarosa y el almidón son fuentes baratas de azúcares a partir de los cuales es posible preparar mezclas de sacarosa: glucosa: fructosa en proporciones similares a los que habitualmente se encuentra en los zumos naturales.

Sin embargo, en los procesos de hidrólisis de almidón se forman productos secundarios (oligosacáridos). La presencia y naturaleza de estos oligosacáridos no depende del origen de los azúcares. El perfil de estos oligosacáridos está condicionado por el método de preparación (ya sea hidrólisis enzimática o por calentamiento en medio ácido), por el tiempo de

Análisis del perfil de azúcares en la autenticación de zumos de frutas

Introducción

hidrólisis y por la concentración y la naturaleza de los azúcares presentes en el medio de reacción, cada fruta tiene un perfil de azúcares característico. Al estudiar el perfil de azúcares, incluidos los oligosacáridos presentes en el zumo, se puede detectar una posible adición de azúcares modificados (Martínez Montero, et al 2004).

En el análisis de zumos los azúcares principalmente cuantificados son la glucosa, la fructosa y la sacarosa y sus relaciones, estos valores pueden verse afectados por la variedad, estado de madurez y el origen geográfico de la fruta utilizada para la producción del zumo. Las diferencias en las proporciones de azúcar pueden ser indicativas de la adición de azúcares exógenos o de mezcla con el zumo de fruta más barato. Así, la disponibilidad de métodos analíticos para el análisis de las huellas dactilares de azúcar en zumos de frutas y otras bebidas no alcohólicas es esencial para la determinación de la autenticidad. Se han desarrollado varios métodos de análisis, principalmente por técnicas cromatográficas, HPLC y GC (Martínez Montero et al., 2004).

El **jarabe de glucosa** se obtiene a partir de almidón por hidrólisis. Se trata de una disolución acuosa compuesta de glucosa, fructosa, maltosa, oligosacáridos y polisacáridos, que contienen una proporción diferente entre unos y otros dependiendo del método de hidrólisis y grado de conversión.

Se obtiene por la hidrólisis enzimática de almidón de distintos productos naturales, de la patata, del maíz, del trigo...se puede realizar una hidrólisis parcial o total, dando paso a distintos productos. El Codex alimentarius recoge los siguientes como productos destinados al consumo humano, tanto vendidos directamente como utilizados por la industria en la elaboración de productos alimenticios:

- Dextrosa anhidra. D-glucosa purificada y cristalizada sin agua de cristalización, con un contenido de D-glucosa de no menos de 99,5% m/m sobre peso seco y un contenido total de sólidos de no menos del 98,0% m/m.
- Dextrosa en polvo (dextrosa glacé). Dextrosa anhidra finamente pulverizada o dextrosa monohidrato o mezclas de ambas, con o sin adición de un agente antiaglutinante.

Análisis del perfil de azúcares en la autenticación de zumos de frutas

Introducción

- Jarabe de glucosa. Disolución acuosa concentrada y purificada de azúcares nutritivos obtenidos del almidón y/o inulina. El jarabe de glucosa tiene un contenido equivalente de dextrosa de menos del 20% m/m, y un contenido total de sólidos de no menos del 70%.
- Jarabe de glucosa deshidratado. Jarabe de glucosa del que se ha separado parcialmente el agua para obtener un contenido total de sólidos de no menos del 93,0%.

En Europa, el jarabe de glucosa suele proceder del trigo o de la patata, mientras que en Estados Unidos es generalmente de maíz.

Es un producto muy utilizado en la industria con distintas finalidades, por ejemplo en las masas fermentadas y masas batidas (panadería, repostería, etc.), por su acción higroscópica, es decir, es un azúcar que retiene la humedad y conserva los productos en mejores condiciones por más tiempo.

Su densidad y textura es apropiada para la industria de los caramelos, jarabes y bebidas.

El **azúcar invertido** es más dulce que el azúcar común o sacarosa y ayuda a mantener el sabor dulce y la humedad de los productos en los que se aplica. Es el líquido o jarabe resultante del proceso de inversión de la sacarosa mediante la acción ácida o enzimática. Según el grado de hidrólisis se obtiene una mezcla de glucosa-fructosa-sacarosa en distintas proporciones.

Si se llega a la hidrólisis total de la sacarosa se obtiene un líquido ligeramente dorado y espeso con igual contenido de glucosa y fructosa pero que endulza más que el azúcar, por lo tanto, se aplica en menor cantidad. La fructosa es más dulce que la glucosa, y ambos componentes por separado multiplican el poder edulcorante de la sacarosa de la que proceden.

Aunque el uso de estos azúcares está permitido en muchos alimentos, como ya se ha indicado, su adicción a los zumos y néctares no está permitida, por lo que supone un fraude. Mediante diversos métodos de análisis se trata de determinar el perfil de azúcares de un zumo y así detectar la posible adicción de azúcares.

1.3. CONTROL DE CALIDAD Y AUTENTICACIÓN DE LOS ZUMOS DE FRUTAS.

La norma general del Codex para zumos de fruta y néctares (CODEX STAN 247-2005) define los criterios de calidad como: los zumos y néctares de frutas deberán tener el color, aroma y sabor del zumo de la misma clase de fruta de la que se hace. La fruta no deberá retener agua del lavado, del vapor u otras operaciones preparatorias que técnicamente son inevitables. El término de autenticidad se define como el mantenimiento en el producto de las características físicas, químicas, organolépticas y nutricionales de la fruta de la que procede.

El contenido de fruta representa el principal parámetro de calidad de purés de frutas, bebidas de frutas y productos de frutas en general. Las especificaciones y la composición del etiquetado de los productos a base de frutas se deben cumplir a fin de mantener la calidad del producto y la autenticidad. Desde el punto de vista económico, la calidad del producto también es importante debido a la competencia entre los productores. Además, la calidad y la autenticidad son de particular importancia con respecto a la expectativa del consumidor (Fügel *et al.*; 2005).

Las bebidas no alcohólicas como los refrescos son elaborados principalmente con los zumos de fruta, agua y aditivos de alimentos que contribuyen en el color y sabor final, ya que no son productos naturales. Las estrictas regulaciones sobre el uso de los aditivos alimentarios dicen que su uso en zumos está prohibido. Los zumos y néctares se caracterizan por su composición natural.

En la industria alimentaria, los productos finales deben alcanzar un compromiso entre varias propiedades, incluyendo las propiedades sensoriales, sanitarias y tecnológicas. Entre estos últimos, las propiedades sensoriales y sanitarias son fundamentales porque influyen en la elección del consumidor y la preferencia. No obstante, la gestión de estas propiedades desde la fase de fabricación con el fin de controlarlos no es una tarea fácil. No siempre es

Análisis del perfil de azúcares en la autenticación de zumos de frutas

Introducción

posible utilizar bases de datos para el control de calidad de productos alimenticios (Perrot et al.; 2006).

La industria de los zumos de frutas es uno de los sectores más dinámicos de la industria de bebidas en todo el mundo. Muchos tipos diferentes de frutas están siendo transformados en zumo, aunque las naranjas todavía proporcionan la mayor parte de los zumos de frutas y otros productos de frutas vendidas en todo el mundo (García-Wass *et al.*; 2000). Los consumidores esperan que los fabricantes y los minoristas proporcionen zumos de frutas sanos y auténticos. Estos factores han hecho hincapié en la necesidad de técnicas fiables que pueden autenticar la pureza de los zumos de frutas.

Los precios de los zumos de fruta de primera calidad representan objetivos propicios para la adición de azúcares no declarados ya que para los zumos de mezcla de alto precio se pueden usar frutas más baratas. Los productos obtenidos no muestran la correspondencia entre su composición y la de la fruta especificado en la etiqueta. Por este motivo, se han hecho numerosos intentos de encontrar métodos adecuados para el control de la autenticidad y la determinación del contenido de fruta en los productos a base de frutas. El problema analítico es importante debido a la complejidad de los productos específicos y a la variación sustancial de los componentes de la fruta. Las técnicas analíticas para hacer frente a este reto son tan variadas como son las formas de adición de azúcares no declarados, que van desde la determinación de los parámetros químicos clásicos a las técnicas instrumentales altamente sofisticadas (Fügel *et al.*; 2005).

El análisis de solo un componente de un zumo natural sería insuficiente para proporcionar información del zumo, por lo tanto, son necesarios múltiples análisis químicos de los componentes para evaluar las diferencias entre zumos adulterados o no adulterados. Por ejemplo, la detección por HPLC-PDA-MS nos da huellas dactilares para evaluar la autenticidad de los jugos de granada (Borges y Crozier 2012). Este enfoque, sin embargo, requiere mucho tiempo y es caro. Hay muchos métodos diferentes para la evaluación y análisis de la autenticidad de los alimentos y la detección de la adulteración según se indica en la norma CODEX STAN 247-2005.

Análisis del perfil de azúcares en la autenticación de zumos de frutas

Introducción

Así, para la determinación de la autenticidad de zumos y detección de la adulteración se hace una combinación de los análisis químicos de los siguientes componentes del zumo como los polifenoles, ácidos orgánicos, azúcares, aminoácidos y metales (Garcia-Wass *et al.*; 2000).

La norma general del Codex para zumos y néctares de frutas (CODEX STAN 247-2005) indica que los zumos y néctares de frutas deberán someterse a las pruebas de la autenticidad, composición y calidad cuando sea necesario. La verificación de la autenticidad y calidad de una muestra puede ser evaluada por comparación de los datos, generados usando métodos apropiados incluidos en el estándar, con la fruta del mismo tipo y de la misma región, permitiendo variaciones naturales, cambios estacionales y variaciones que se producen debido al procesamiento (Codex satnd 247-2005). En la Tabla 1.8 se muestran varios métodos que destaca el Codex 247-2005 donde se proponen criterios de calidad y autenticidad para determinar.

Análisis del perfil de azúcares en la autenticación de zumos de frutas

Introducción

Tabla 1.8. Métodos de análisis y muestreo existentes (CODEX STAN 247-2005).

Disposición	Método	Principio	Tipo
Las antocianinas (Criterios de calidad y autenticidad)	Método IFU No. 71 (1998)	Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	I
Remolacha de azúcar en los zumos (Criterios de calidad y autenticidad)	AOAC 995.17	Deuterio de Resonancia Magnética Nuclear (RMN deuterio)	II
C13/C12 proporción de etanol derivado de zumos de frutas (Criterios de calidad y autenticidad)	JAOAC 79, No. 1, 1996, 62-72	Espectrometría de masas de isótopos estables	II
Aceites esenciales (titulación Scott) (Criterios de calidad y autenticidad)	AOAC 968.20 Método IFU No. 45	(Scott) la destilación, la titulación	I
Fermentabilidad (Criterios de calidad y autenticidad)	Método IFU No. 18 (1974)	Método microbiológico	I
Los aminoácidos libres (Criterios de calidad y autenticidad)	EN 12742 (1999) Método IFU No. 57 (1989)	Cromatografía líquida	II
Jarabe de maíz de alta fructosa y jarabe de inulina hidrolizada en el jugo de manzana (Ingredientes permitidos)	JAOAC 84, 486 (2001)	Cromatografía de gases con columna capilar	IV
Relación de ácido L-málico/ácido málico total en el jugo de manzana (Criterios de calidad y autenticidad)	AOAC 993.05	Determinación enzimática y cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC)	II
Prolina por fotometría - no específico determinación (Criterios de calidad y autenticidad)	EN 1141 (1994) Método IFU No. 49 (1983)	Fotometría	I
Sodio, potasio, calcio y magnesio en zumos de frutas (Criterios de calidad y autenticidad)	EN 1134 (1994) Método IFU No. 33 (1984)	Espectroscopía de Absorción Atómica	II

1.3.1. Análisis de azúcares.

La medida de los azúcares en frutas o productos frutales es de considerable importancia desde el punto de vista de la validación de la autenticidad, valoración de la calidad y grado de maduración y control de la posible alteración microbiológica durante el almacenamiento.

Las aplicaciones del análisis de azúcares desarrolladas durante los últimos años están orientadas al desarrollo de productos y control de calidad del producto acabado, determinación de la autenticidad y detección de la adición de compuestos no indicados en el etiquetado y/o no permitidos (Jamin et al.; 1997).

Una gran variedad de métodos se han desarrollado y adaptado para determinar un amplio rango de azúcares y derivados (alcoholes de azúcar, oligosacáridos, etc.) en bebidas como zumos de frutas, vino, cerveza, bebidas no alcohólicas, etc. (Ye y Baldwin 1994).

Es difícil detectar la adición de azúcares en alimentos ricos en hidratos de carbono, como los zumos de frutas, debido a la existencia de una gran variedad de edulcorantes comerciales diseñados para coincidir exactamente con los perfiles de carbohidratos mayoritarios de estos alimentos. Se han desarrollado métodos muy variados para detectar la adición de diversos tipos de azúcares en zumos de frutas (Jamin et al.; 1997) como los derivados del maíz y la caña de azúcar (Day et al.; 2001). Si se adicionan jarabes de glucosa, la fracción de oligosacáridos revela siempre la presencia de maltosa, isomaltosa, maltotriosa y otros polímeros de glucosa (Low 1996). En los zumos elaborados a partir de zumo concentrado, algunos oligosacáridos endógenos pueden estar presentes en cantidades reducidas, lo que dificulta la detección de la adición de azúcares añadidos.

Métodos colorimétricos: azúcares reductores.

Las pruebas colorimétricas para la determinación de azúcares se basan en la reacción específica de estos compuestos con determinados reactivos para dar derivados coloreados. La formación de color se toma como resultado positivo e indica la presencia del compuesto en cuestión, mientras que la no formación de color es un indicativo de su ausencia.

Hay una amplia gama de métodos colorimétricos que permiten la determinación cualitativa y cuantitativa de azúcares. Aunque son métodos muy generales, algunos de ellos permiten discriminar entre diferentes tipos de azúcares. Así hay métodos de determinación de azúcares reductores, de pentosas y hexosas, aldosas y cetosas, mono, oligo y polisacáridos, etc. En todos ellos el fundamento es similar, el azúcar con otro reactivo forma productos coloreados que se pueden determinar cuantitativamente por espectrofotometría.

Los carbohidratos que presentan grupos aldehídicos libres o en forma hemiacetálica (grupos aldehídicos potenciales) no bloqueados (por ejemplo formando parte de un enlace glicosídico) pueden ser oxidados por diferentes reactivos, por lo que se les denomina azúcares reductores.

Hay diferentes métodos de determinación de azúcares reductores (Fehling, Benedict, Bradford, Nelson-Somogyi, etc.). En todos ellos, el azúcar reductor es oxidado por el catión cúprico (Cu^{+2}) en medio alcalino, con formación de óxido cuproso insoluble, lo que da la típica coloración rojizo-amarillenta. Los iones Cu^{+2} se pueden mantener en disolución, formando complejos coloreados con tartratos y citratos, lo que permite la determinación de azúcares reductores. Estos métodos se emplean comúnmente por su sensibilidad, alta especificidad y rápida ejecución.

Índice de refracción: °Brix.

Los °Brix son utilizados en la industria de las bebidas basadas en zumos de frutas, como un índice comercial, aproximado, de la concentración de azúcares. Para determinar los °Brix, se usa un refractómetro.

Los °Brix se definen como la concentración en sólidos solubles del zumo. En principio eran una medida de densidad y esta densidad corresponde también al índice de refracción. En las disoluciones azucaradas, está relacionado el índice de refracción, con la densidad y con los °Brix, porque al aumentar la concentración de azúcares aumenta la densidad y con ello el índice de refracción.

Pero como los sólidos disueltos no son solo azúcares, sino que hay otros compuestos, 1°Brix no equivale exactamente a una concentración de sólidos disueltos de 1g/100ml. Por tanto esto es un valor aproximado.

Los °Brix de los zumos comerciales se encuentran entre 11 y 14 °Brix, unos estarán más cerca de 11 y otros de 14 en función de la fruta de la que proceda el zumo.

Análisis enzimáticos.

Dos tipos de análisis enzimáticos son comunes para la detección específica y cuantificación de azúcares: el específico para monosacáridos y, el específico para la hidrólisis de oligosacáridos de cadena larga. Dichos métodos son extremadamente resolutivos pero se ven limitados por las interferencias derivadas de los contaminantes presentes en las disoluciones de prueba, e incluso por la presencia de otros azúcares, sales y metales. Además, tanto la pureza como el origen de las enzimas, resultan ser críticos en la determinación de los carbohidratos.

La fuerte especificidad de los métodos enzimáticos, resulta ser igualmente contraproducente, dado que cada uno de los carbohidratos, requieren tanto de diferentes condiciones para su análisis, como de diferentes series de enzimas.

Análisis del perfil de azúcares en la autenticación de zumos de frutas

Introducción

Mientras que los métodos enzimáticos han sido los seleccionados para algunos carbohidratos, particularmente la glucosa; los métodos cromatográficos han sido de gran valía en el análisis de zumos donde se presenta una mezcla de azúcares. Se utiliza tanto la cromatografía gaseosa (GC) como la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Estos métodos ofrecen gran especificidad y la capacidad de detectar varios azúcares al mismo tiempo.

Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

En el análisis de azúcares y de otros compuestos la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) se ha convertido en una técnica muy utilizada debido a su sensibilidad, su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, su idoneidad para la separación y su aplicabilidad a sustancial que son de primordial interés en la industria, en este caso la alimentaria (Skoog *et al.*, 2003).

La cromatografía es un método físico de separación basado en la distribución de los componentes de una mezcla entre dos fases inmiscibles, una fija o estacionaria y otra móvil. En cromatografía líquida de alta resolución, la fase móvil es un líquido que fluye a través de una columna que contiene a la fase fija. Los distintos compuestos presentes en una muestra se separan según su mayor o menor afinidad con la fase móvil y la estacionaria.

Como podemos observar en la Figura 1.13 la cromatografía de alta resolución (HPLC) contienen los siguientes elementos:

- Sistemas de bombeo. Son necesarios para conseguir y regular la presión y velocidad de flujo de la fase móvil.
- Sistemas de inyección. Son válvulas dosificadoras que permiten regular la aplicación de la muestra en volúmenes de 5 a 500µl.
- Columna. Contiene las partículas de la fase estacionaria. Hay precolumnas que se colocan delante de las columnas para eliminar la materia en suspensión y contaminantes de las disolvente.

Análisis del perfil de azúcares en la autenticación de zumos de frutas

Introducción

- Detectores. Responderán a una propiedad de la fase móvil. Deben de tener: una sensibilidad adecuada, estabilidad y reproducibilidad buena, tiempo de respuesta corto, manejo sencillo, respuesta selectiva a algunos analitos, y una respuesta rápida e independiente del caudal.
- Sistema para el tratamiento de datos. Es indispensable para registrar los cambios en alguna propiedad en función del tiempo. La representación gráfica de estos registros se llama cromatograma. En estos registros aparecen una serie de picos simétricos sobre el eje de los tiempos para la identificación cuantitativa (área bajo los picos) y cualitativa (posición en el eje) de los componentes de la muestra.

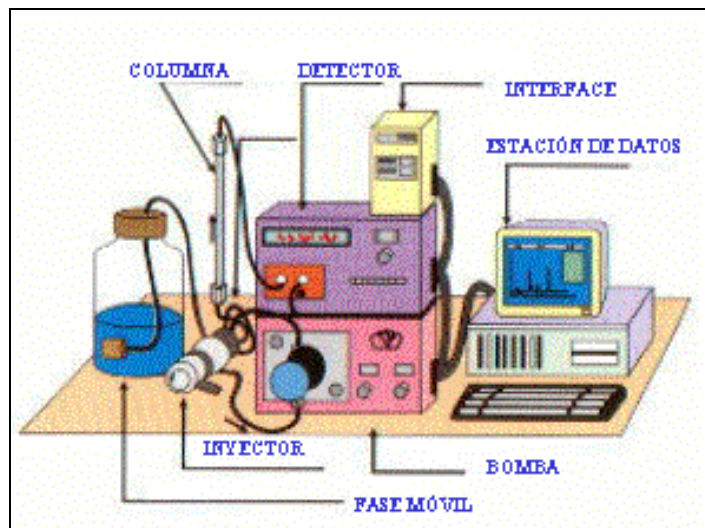


Figura 1.13. Esquema de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

En el análisis de carbohidratos por HPLC hay que diferenciar entre separación y detección. Los métodos de HPLC con columnas amino e índice de refracción (RI) de detección han sido durante varios años, los más descritos para el análisis de azúcares. Las columnas de fase reversa no son muy útiles ya que los azúcares no interactúan con las cadenas hidrofóbicas C-8 ó C-18 y es necesario hacer una derivatización de la muestra. Actualmente para la separación de azúcares la columna más usada es la columna metrosep-carb1 de intercambio iónico a pH alto.

Análisis del perfil de azúcares en la autenticación de zumos de frutas

Introducción

En cuanto a los sistemas de detección, el detector de índice de refracción (IR) está basado en el principio de que un haz de luz se refracta dependiendo de la sustancia a través de la cual pasa. Un haz que pasa a través de una disolución de agua y azúcar refractará más que un haz de luz que pase a través de agua únicamente.

La diferencia entre las respectivas refracciones de la fase móvil y los analitos pueden ser medidas y expresadas como una respuesta electrónica. Este método posee una excelente sensibilidad con bajos niveles con contenido de azúcar. Así, el detector de índice de refracción (RI) ha sido habitualmente el más utilizado para el análisis de azúcares.

Como desventaja de este detector, es preciso destacar que no permite la elución en gradiente y es muy sensible a cambios en el flujo y la temperatura.

También se ha utilizado el sistema de detección de azúcares mediante dispersión de luz por evaporación (ELSD). Esta técnica ha revolucionado el análisis de lípidos por HPLC desde su introducción en 1980. Este tipo de detector utiliza un aerosol que atomiza continuamente el eluyente de la columna en pequeñas gotas. Estas gotitas se dejan evaporar, dejando los solutos como las partículas finas suspendidas en el gas de atomización.

Este tipo de detector puede ser utilizado para todos los solutos que tienen una volatilidad menor que la fase móvil.

En el ELSD, la fase móvil entra en el detector, se evapora en un dispositivo caliente y el soluto restante es finalmente detectado por la forma en que se dispersa la luz. La intensidad de la luz dispersada por partículas sólidas en suspensión depende de su tamaño de partícula. Esto, a su vez, depende del tamaño de las gotitas generadas por el nebulizador y la concentración de soluto en las gotitas. El tamaño de gota producido en el nebulizador depende de las propiedades físicas del líquido y la velocidad relativa, y el flujo de gas y líquido.

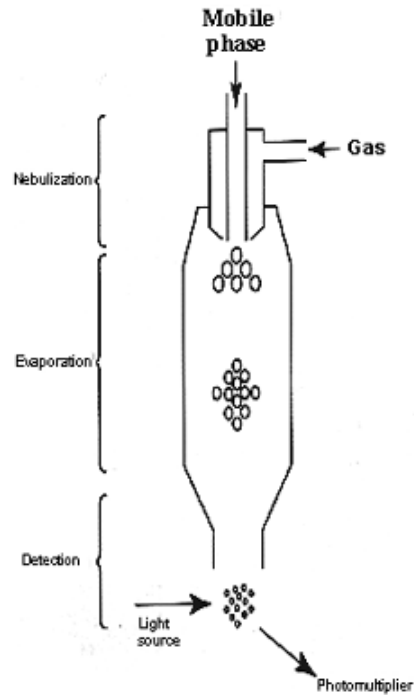


Figura 1.14. Esquema del funcionamiento del ELSD.

Cromatografía de intercambio iónico de alta eficacia con detección amperométrica de pulsos (HPAEC-PAD)

La detección amperométrica de pulsos (PAD), que combinada con el uso de una columna de intercambio iónico ha generado una técnica de análisis HPAEC-PAD: Cromatografía de intercambio iónico de alta eficacia con detección amperométrica de pulsos.

Esta técnica cromatográfica permite la cuantificación directa de carbohidratos no derivatizados a niveles de picomoles con una mínima separación de muestra. La cromatografía de HPAEC aprovecha el carácter débilmente ácido de los carbohidratos y alcoholes de azúcar para proporcionar separaciones altamente selectivas a pH elevado, usando como fase estacionaria un fuerte intercambiador de aniones. Este acoplamiento entre cromatografía líquida y detección electroquímica ha permitido la detección de carbohidratos en una gran variedad de matrices complejas, como alimentos, bebidas, productos lácteos, etc. Tanto HPAEC como PAD necesitan fases móviles de elevado pH, que permitan la separación cromatográfica de los azúcares en forma aniónica (mediante intercambio aniónico) y su posterior oxidación en el electrodo.

Análisis del perfil de azúcares en la autenticación de zumos de frutas

Introducción

La cromatografía iónica es un procedimiento de separación de iones de carga del mismo signo por elución en una columna empaquetada con resina finamente dividida.

Se ha descrito el uso de resinas de intercambio aniónico (Andersen y Sorensen 2000) y de resinas poliméricas macroporosas (Cataldi *et al.*; 1999): las resinas de intercambio aniónico son fases del tipo poliestireno-divinilbenceno (Casella *et al.*; 1999) o etilvinilbenceno-divinilbenceno sulfonado, ambos enlazados a aminas cuaternarias (fuertes intercambiadores aniónicos).

En la Tabla 1.9 se comparan las principales columnas de intercambio iónico. La columna CarboPac PA1 se considera como la más adecuada para el análisis de monosacáridos. Esta columna está empaquetada con unidades de resina polimérica no porosa, denominada *MicroBead*. Este tipo de resinas presentan una rápida transferencia de masa, una elevada estabilidad frente al pH (pH 0-14) y una excelente resistencia mecánica que les permite soportar presiones de hasta 4000 psi (28 MPa). La regeneración de la columna después de un análisis en gradiente es rápida (suele durar 10 minutos o menos). En la Figura 1.15 se muestra una unidad de resina polimérica *bead*.

Análisis del perfil de azúcares en la autenticación de zumos de frutas

Introducción

Tabla 1.9. Comparación de las columnas Carbo Pac MA1, PA1 Y PA-100.

Características	CarboPac MA1	CarboPac PA1	CarboPac PA-100
Aplicaciones recomendadas	Análisis de alcoholes de azúcar (mono- y disacáridos) en alimentos, fluidos fisiológicos y sacáridos glicoconjugados reducidos	Análisis composicional de monosacáridos, separaciones de homopolímeros lineales y purificación de sacáridos	Análisis y determinación de oligosacáridos
Composición de la resina	Sustrato macroporoso de cloruro de vinilbencil/divinilbenceno (diámetro: 8.5 μm) totalmente funcionalizado con un grupo amonio alquil sustituido	Sustrato de poliestireno/divinilbenceno (diámetro: 10 μm) aglomerado con una red de aminas cuaternarias funcionalizadas de <i>MicroBead</i> de 350 nm	Sustrato de etil vinil benceno/divinilbenceno (diámetro: 10 μm) aglomerado con una red de aminas cuaternarias funcionalizadas de <i>MicroBead</i> de 350 nm
Capacidad de intercambio aniónico	4500 μeq para una columna de 4x250 mm	100 μeq para una columna de 4x250 mm	90 μeq para una columna de 4x250 mm
Velocidad de flujo recomendada	0.4 mL/min (para una columna de 4x250 mm)	1 mL/min (para una columna de 4x250 mm)	1 mL/min (para una columna de 4x250 mm)
Rango de pH compatible	0-14	0-14	0-14
Compatibilidad con disolventes orgánicos	0%	0-2%	0-100%
Presión máxima permitida	2000 psi (14 MPa)	4000 psi (28 MPa)	4000 psi (28 MPa)

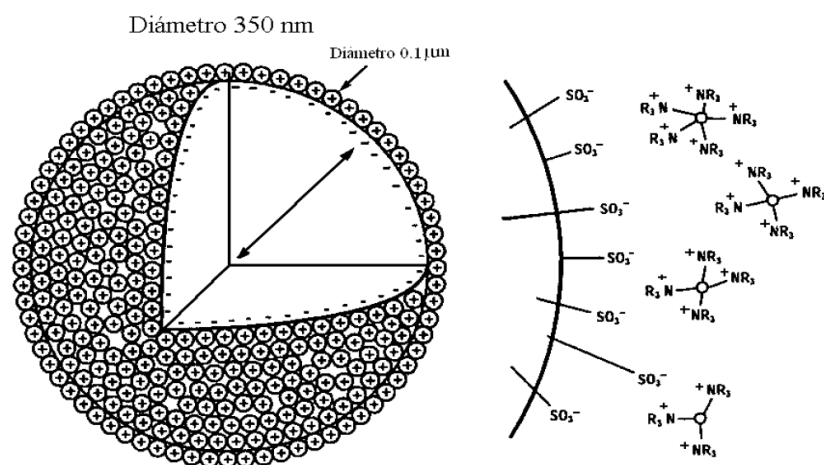
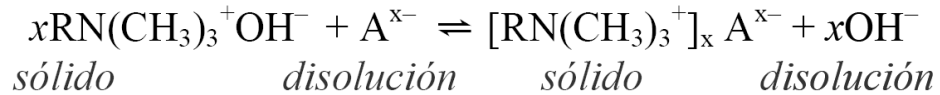


Figura 1.15. Unidad de resina polimérica bead.

Análisis del perfil de azúcares en la autenticación de zumos de frutas

Introducción

El intercambio aniónico que se produce en la columna cuando la muestra (que contiene analitos aniónicos A_x^-) interacciona con el intercambiador aniónico, se describe mediante el siguiente equilibrio:



Donde R representa la parte de la molécula de la resina que contiene una amina cuaternaria. La elución se produce debido a que la fase móvil que transporta la muestra contiene un ión que compite con los analitos iónicos por los grupos cargados sobre la superficie de la resina.

Debido a que los azúcares neutros y los alcoholes de azúcar son ácidos débiles (tienen valores de pK_a entre 12 y 14, ver Tabla 1.10), se necesitan fases móviles fuertemente alcalinas para que los carbohidratos estén en su forma aniónica y puedan ser separados por cromatografía de intercambio aniónico (a elevado pH, los grupos hidroxilo de los carbohidratos estarán total o parcialmente transformados en oxianiones). Esto no es posible con las columnas clásicas basadas en sílice porque el elevado pH disuelve el relleno. Los tiempos de retención están directamente relacionados con el pK_a del compuesto. Este tipo de cromatografía tiene en cuenta los pK_a de todos los grupos hidroxilo del azúcar, lo que permite separar isómeros como galactosa, manosa y glucosa (con fases móviles con $[\text{OH}^-] < 20 \text{ mM}$ (Cataldi *et al.*; 2000)), que poseen el mismo peso molecular y el mismo número de grupos hidroxilo.

Análisis del perfil de azúcares en la autenticación de zumos de frutas

Introducción

Tabla 1.10. Valores de pK_a de algunos azúcares y alcoholes de azúcar.

Azúcar	pK_a
Fructosa	12,03
Manosa	12,08
Xilosa	12,15
Glucosa	12,28
Galactosa	12,39
Dulcitol (galactitol)	13,43
Sorbitol (D-glucitol)	13,60

Es importante resaltar que el levado pH empleado en HPAEC evita la epimerización y tautomería ceto-enólica de los monosacáridos (Ratsimba *et al.*; 1999). Estos compuestos siempre dan picos sencillos y estrechos bajo las condiciones de HPAEC. Lo mismo ocurre con los amino azúcares N-acetilados, que no experimentan reacciones de degradación incluso a elevadas concentraciones de hidróxido, probablemente debido a que el tiempo de separación es relativamente corto. Como los alditoles no sufren epimerización en medio básico, se puede evitar la epimerización de los oligosacáridos si éstos son reducidos a alditoles antes del procedimiento cromatográfico.

Al igual que en las técnicas de HPLC, la filtración y desgasificación con helio de los eluyentes antes de su uso, así como la filtración de las muestras con filtros de 0.45 μm , constituyen prácticas generalizadas. También es frecuente el uso de una precolumna. La presencia en la fase móvil alcalina de iones Ba^{2+} mejora la selectividad y la reproducibilidad a la vez que acorta el tiempo de análisis, ya que permite la precipitación del carbonato, que constituye una sustancia interferente (Cataldi *et al.*; 1999). Con esta operación no son necesarias las precauciones en la preparación del eluyente alcalino y la regeneración de la columna después de cada inyección.

En cuanto al sistema de detección, la detección amperométrica de pulsos (Gey *et al.*; 1996) permite la detección directa de carbohidratos, además de proporcionar una elevada sensibilidad y selectividad, frente a la naturaleza compleja de las muestras reales de carbohidratos.

Análisis del perfil de azúcares en la autenticación de zumos de frutas

Introducción

Hughes y Johnson introdujeron en 1981 la detección amperométrica de pulso y de triple pulso (Hughes y Johnson 1982). En 1983, Rocklin, R.D. y Pohl, C.A. (Rocklin y Pohl 1983) y Edwards, P. y Haak, K.K. (Edwards y Haak 1983) aplicaron por primera vez la HPAEC acoplada con PAD a la determinación de carbohidratos. En la actualidad, HPAEC-PAD constituye el método más comúnmente utilizado para la detección de azúcares y polioles con excelente sensibilidad y selectividad y una mínima preparación de muestra.

La amperometría de pulsos se basa en la oxidación de las moléculas en la superficie de un electrodo de oro. La corriente generada es proporcional a la concentración de azúcares, por lo que estos compuestos pueden ser detectados y cuantificados. Para comprender el mecanismo de la amperometría de pulsos, es necesario estudiar primero la oxidación de un analito mediante una técnica electroquímica convencional como la voltametría. La voltametría cíclica de la glucosa en hidróxido sódico 0,1 M, utilizando un electrodo de trabajo de oro y el electrodo de referencia Ag/AgCl, se muestra en la Figura 1.16.

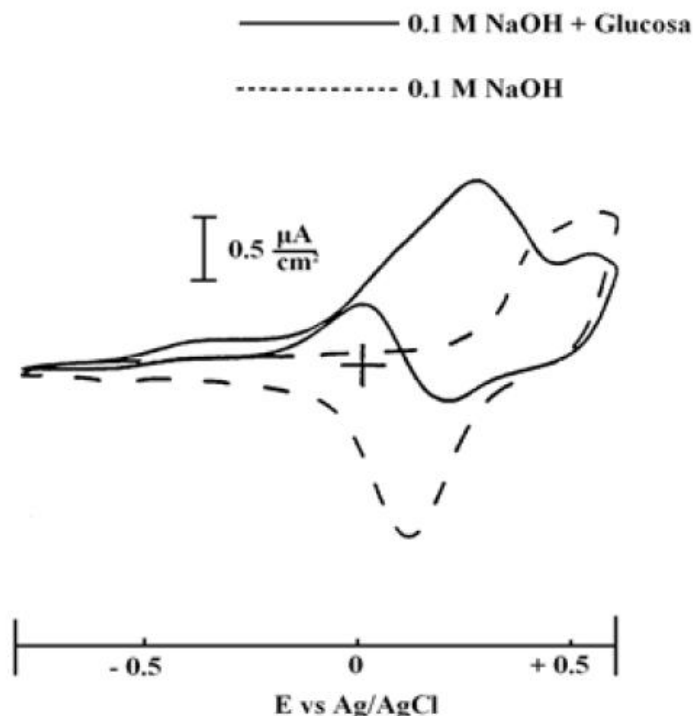


Figura 1.16. Voltametría cíclica de la glucosa

Análisis del perfil de azúcares en la autenticación de zumos de frutas

Introducción

La línea discontinua de la Figura 1.16 representa la corriente resultante del electrolito se soporte hidróxido sódico 0,1 M en ausencia de glucosa; es decir, la corriente de fondo. Comenzando a -0,8 V y haciendo un barrido en dirección positiva, la corriente de fondo es prácticamente despreciable hasta aproximadamente 0,25 V, donde comienza la oxidación de la superficie del electrodo de oro (formándose óxido de oro). Si se hace un barrido en sentido contrario a partir de 0,6 V, el óxido de oro vuelve a reducirse a oro, con el pico de corriente negativo a 0,1 V.

Cuando se añade la glucosa a la disolución (línea continua), la corriente aumenta suavemente a medida que se hace un barrido en dirección positiva desde -0,8 V, hasta que empieza la oxidación de la glucosa. Esto hace que la corriente aumente a -0,15 V y se forme un pico a un potencial aproximado de 0,25 V. A partir de este potencial, la corriente disminuye por dos razones:

- En primer lugar, la concentración de glucosa en la superficie del electrodo ha disminuido debido a que gran parte de la glucosa ha sido oxidada.
- En segundo lugar, la formación de óxido de oro inhibe la oxidación de la glucosa.

Si se hace el barrido en sentido inverso, la corriente se invierte de reductora a oxidante (positiva) cuando comienza la reducción del óxido de oro. Al comenzar la reducción del óxido de oro, empieza también la oxidación de la glucosa.

El potencial apropiado para medir la oxidación de la glucosa sería aproximadamente 0,25 V. Éste es el potencial en el que la corriente de oxidación de la glucosa es máxima y la corriente de fondo es mínima. Sin embargo, el uso de un solo potencial produce una disminución rápida de la sensibilidad debido a que se forma una capa de óxido y los productos de la oxidación cubren y envenenan la superficie del electrodo. Por lo tanto, la superficie del electrodo debe ser limpiada entre una medida y la siguiente. Este problema se soluciona aplicando un conjunto de tres potenciales:

Análisis del perfil de azúcares en la autenticación de zumos de frutas

Introducción

- En primer lugar, la corriente de oxidación de la glucosa es medida cerca del pico a 0,25 V.
- A continuación, se lleva el potencial a un valor positivo lo suficientemente elevado como para oxidar la superficie de oro. Esto produce la desorción de los productos de oxidación de los carbohidratos.
- Finalmente, se lleva el potencial a un valor suficientemente negativo como para reducir por completo el óxido de oro de la superficie del electrodo, permitiendo la detección durante el siguiente ciclo. El potencial no debe ser tan bajo como para dar lugar a reducciones químicas (por ejemplo, del oxígeno a peróxido de hidrógeno) que alterarían la línea base durante la siguiente medida al potencial E_1 .

La acción de formar y eliminar repetidamente el óxido en la superficie del metal, limpia la superficie del electrodo y la mantiene activa y estable. El conjunto de estos tres potenciales constituye una *onda o pulso*, y su aplicación repetida es la base de la amperometría de pulsos.

Los tres potenciales empleados se denominan E_1 , E_2 y E_3 (*figura*) y son aplicados durante los tiempos t_1 , t_2 y t_3 , respectivamente. El potencial E_1 es +0,1 V, está por debajo de la corriente del pico a 0,25 V. De esta forma, se minimiza el ruido de la corriente de fondo producida por la formación del óxido de oro y se proporciona un margen de seguridad en los cambios del potencial del electrodo de referencia. La corriente de oxidación de los carbohidratos es medida mediante la integración de la corriente de la celda después de un *delay**. La corriente integrada durante un tiempo fijo es carga, por lo que la respuesta del detector es medida en culombios.

Alternativamente, puede medirse la corriente media durante el periodo de integración.

En ese caso, las unidades empleadas serían amperios.

Análisis del perfil de azúcares en la autenticación de zumos de frutas

Introducción

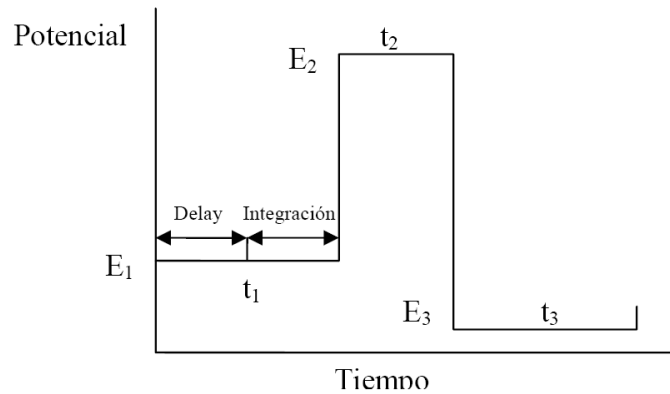


Figura 1.17. Diagrama de la secuencia de pulsos para la detección de carbohidratos

*El paso de un potencial al siguiente produce una corriente de carga que no forma parte de la corriente de oxidación del analito, por tanto, la corriente de oxidación de los carbohidratos es medida después de un pequeño lapso o *delay*, que permite que decaiga la corriente de carga.

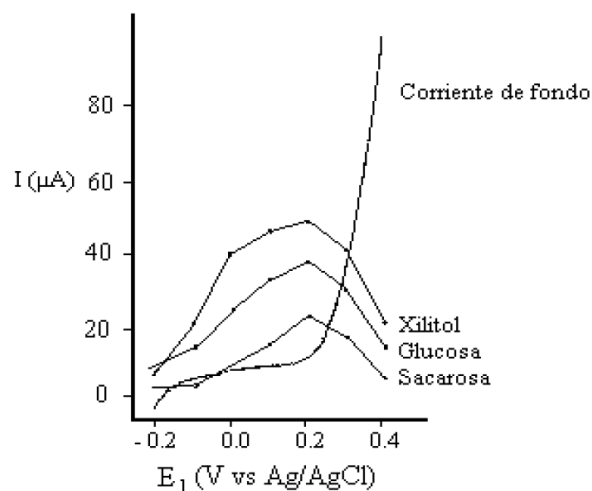


Figura 1.18. Corriente de oxidación generada a diferentes valores de E_1 para tres carbohidratos distintos

La Figura 1.18 muestra que el voltaje que produce la máxima respuesta es el mismo para tres azúcares muy diferentes: xilitol (alcohol de azúcar no reductor), glucosa (monosacárido reductor) y sacarosa (disacárido no reductor). Esto se explica porque la oxidación de los azúcares en el electrodo es catalizada por la superficie del electrodo. Como resultado, la respuesta amperométrica de una clase de compuestos es controlada principalmente por la influencia del estado de la superficie catalítica sobre el potencial de electrodo y no por los potenciales redox de los propios compuestos. La detección

Análisis del perfil de azúcares en la autenticación de zumos de frutas

Introducción

amperométrica de pulsos es, por tanto, un método de detección universal para todos los carbohidratos.

La técnica HPAEC-PAD es extremadamente selectiva y específica para los carbohidratos por dos motivos:

- La amperometría de pulso detecta sólo aquellos compuestos que contienen grupos funcionales oxidables al voltaje de detección empleado. En el caso de los carbohidratos, la sensibilidad es varios órdenes de magnitud mayor que para otras clases de analitos.
- Los componentes neutros o catiónicos de la muestra no se retiene, o lo hacen en pequeña medida. Por lo tanto, aunque esas especies sean susceptibles de oxidarse, no interfieren con el análisis de los carbohidratos, debido a que son eluidos con el frente del disolvente.

La detección amperométrica de pulsos (PAD) es más selectiva y sensible que la detección mediante índice de refracción (RI). Como ya hemos comentado anteriormente, el sistema PAD detecta sólo aquellos compuestos con grupos funcionales oxidables al voltaje de detección empleado, mientras que la detección RI se limita a medir los cambios en el Índice de refracción de la disolución que pasa a través de la celda de flujo. En relación a la sensibilidad, la detección RI es más apropiada para la cuantificación de azúcares mayoritarios, mientras que el sistema PAD es capaz de medir azúcares minoritarios a niveles de trazas (límites de detección alrededor de 10 ppb para carbohidratos no derivatizados).

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE CARATAGENA
ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA
AGRONÓMICA



PROYECTO FIN DE CARRERA

**Análisis del perfil de azúcares en la
autenticación de zumos de frutas**

Objetivos



2. OBJETIVOS

El objetivo general ha sido estudiar el perfil de azúcares por HPAEC-PAD para la autenticación de zumos de frutas de naranja, manzana y piña.

Este objetivo general se ha dividido en los siguientes objetivos parciales:

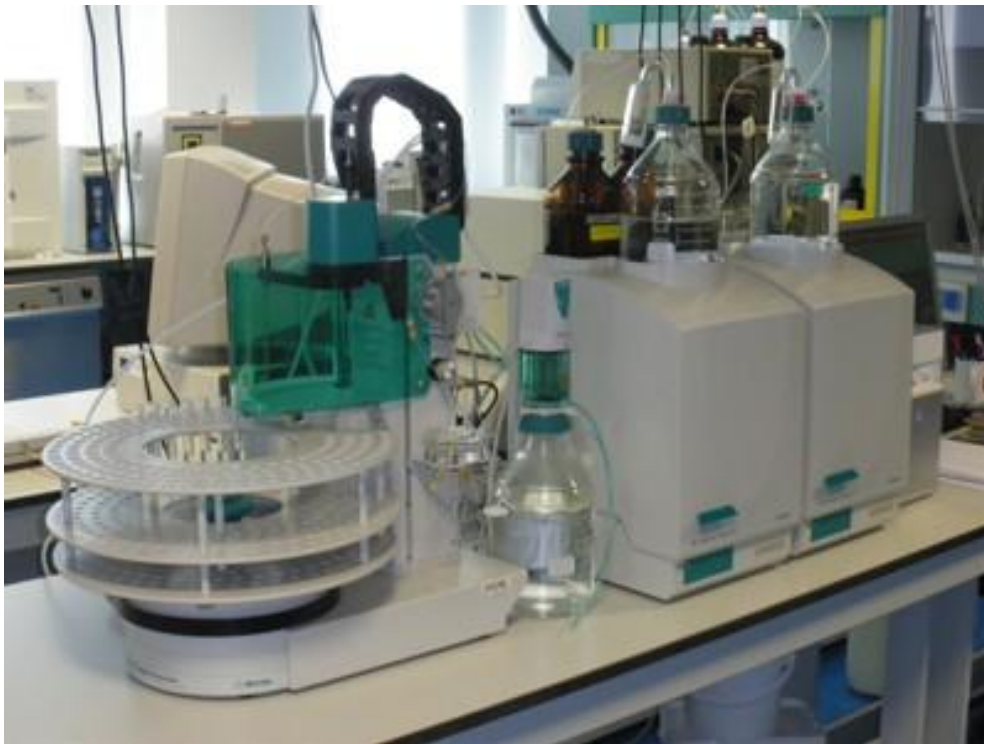
1. Optimizar el método de análisis de azúcares por HPAEC-PAD. Para ello se han ensayado distintas concentraciones de NaOH en la fase móvil y distinta velocidad de flujo. Se han analizado muestras de azúcares, zumos concentrados y zumos comerciales.
2. Determinar el perfil de azúcares de jarabe de glucosa y azúcar invertido. Se han analizado distintas muestras de jarabe de glucosa y azúcar invertido de uso alimentario disponibles en el mercado.
3. Estudiar el perfil de azúcares en zumos concentrados y naturales de naranja, manzana y piña.
4. Comprobar la efectividad del método en la autenticación de zumos en sistemas modelo. Para ello se han diseñado sistemas modelo de zumos reconstituidos a partir de los zumos concentrados estudiados preparados adicionando cuatro de los jarabes de glucosa analizados.
5. Comprobar la efectividad del método en zumos comerciales. Se han analizado zumos de naranja, manzana y piña de distintas casas comerciales, preparados a partir zumos naturales o concentrados
6. Caracterizar las propiedades físico-químicas y sensoriales de los zumos comerciales analizados. Se han determinado distintos parámetros físico-químicos y mediante un panel sensorial se han estudiado propiedades organolépticas.

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE CARTAGENA
ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA
AGRONÓMICA



PROYECTO FIN DE CARRERA
**Análisis del perfil de azúcares en la
autenticación de zumos de frutas**

Materiales y Métodos



3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIALES DE ANÁLISIS

3.1.1. Azúcares

Los azúcares analizados son jarabes de glucosa o azúcares invertidos. Estos azúcares proceden de diferentes casas comerciales encargadas de fabricar azúcares para alimentos y bebidas.

Los **jarabes de glucosa y azúcares invertidos** estudiados se muestran en la Tabla 3.1. La asignación F42, F48, F55 y F85 indica el contenido relativo en fructosa.

Tabla 3.1. Jarabes de glucosa y azúcares invertidos analizados.

Identificación	Características	° Brix
Z10	Jarabe de glucosa-fructosa	70.3
Z11	Isoglucosa	71.3
Z12	Jarabe de glucosa	
Z13	Jarabe de fructosa y glucosa F42	69.6
Z14	Jarabe de fructosa y glucosa F42	69.2
Z15	Jarabe de fructosa y glucosa F42	69.2
Z16	Jarabe de fructosa y glucosa F42	67.0
Z17	Jarabe de azúcar invertido F48	67
Z18	Jarabe de fructosa y glucosa F55	74.6
Z19	Jarabe de glucosa y fructosa F85	74

3.1.2. Zumos

Dentro de los zumos tenemos que distinguir entre: zumos concentrados, zumos naturales, zumos reconstituidos y zumos comerciales.

Los **zumos concentrados** estudiados han sido de tres tipos: zumo concentrado de naranja, de manzana y de piña. Estos zumos fueron obtenidos por una empresa suministradora de zumos concentrados.

Los **zumos naturales** se obtuvieron en el laboratorio a partir de la fruta fresca que fue comprada en el supermercado. Primero se pelaron las frutas y luego se obtuvo el zumo utilizando una licuadora, se obtuvieron así zumos naturales de naranja, manzana y piña.

Los **zumos reconstituidos** se prepararon en el laboratorio a partir de zumos concentrados y jarabes de glucosa. Los jarabes de glucosa utilizados fueron el Z13, Z14, Z15 y Z16, y los tres zumos concentrados: naranja, manzana y piña. Así se obtuvieron 12 zumos reconstituidos, cuatro de cada fruta estudiada.

Los **zumos comerciales** de naranja, manzana y piña analizados se adquirieron en supermercados locales. Se compraron 10 zumos de naranja, 5 zumos de manzana y otros 5 de piña. A continuación, en la Tabla 3.2 se describen las características de cada zumo comercial de naranja. Tenemos 3 zumos que no provienen de concentrado y son refrigerados, 4 que provienen de concentrado y no son refrigerados y 3 que no provienen de concentrado y no son refrigerados.

Análisis del perfil de azúcares en la autenticación de zumos de frutas

Materiales y Métodos

Tabla 3.2. Características de los zumos comerciales de naranja.

Zumos de naranja	Clase
ZN1	No de concentrado, refrigerado
ZN2	
ZN3	
ZN4	De concentrado, no refrigerado
ZN5	
ZN6	
ZN7	
ZN8	No de concentrado, no refrigerado
ZN9	
ZN10	

En la Figura 3.1 podemos ver algunos de los zumos comerciales que fueron comprados para analizar.



Figura 3.1. Algunos zumos comerciales de naranja analizados.

Análisis del perfil de azúcares en la autenticación de zumos de frutas

Materiales y Métodos

En la siguiente Tabla 3.3 se describen las características de cada zumo comercial de manzana. Tenemos 4 zumos que provienen de concentrado y no son refrigerados y 1 zumo que no proviene de concentrado y es refrigerado.

Tabla 3.3. Características de los zumos comerciales de manzana.

Zumos de manzana	Clase
ZM1	De concentrado, no refrigerado
ZM2	
ZM3	
ZM4	
ZM5	No de concentrado, refrigerado

Por último, en la Tabla 3.4 se muestran los zumos comerciales de piña analizados. Hay 2 zumos que provienen de concentrado y no son refrigerados, 2 zumos que no provienen de concentrado y son refrigerados y 1 zumo que no proviene de concentrado y no es refrigerado.

Tabla 3.4. Características de los zumos comerciales de piña.

Zumos de piña	Clase
ZP1	De concentrado, no refrigerado
ZP2	
ZP3	No de concentrado, refrigerado
ZP4	
ZP5	No de concentrado, no refrigerado

3.1.3. Sustancias químicas.

El agua fue destilada en un sistema de purificación del agua Milli-Q de Millipore (Bedford, MA, USA). Los patrones de azúcares usados en los análisis por HPAEC-PAD fueron de la marca SIGMA (Madrid, España). Los patrones analizados fueron de sacarosa, fructosa, glucosa, maltosa y sorbitol.

El hidróxido sódico y el biftalato potásico utilizados para calcular la acidez valorable eran de la casa Paureac.

3.2. MÉTODOS.

3.2.1. Determinación de pH.

El pH es la medida del grado de acidez o alcalinidad de una disolución acuosa y se define como el logaritmo negativo de la concentración de iones H^+ . Para su determinación se utiliza un pHmetro “pHmeter GLP22” de la casa Crison (Alella, Barcelona) (Figura 3.2).



Figura 3.2. pH-metro Crison.

Éste pHmetro contiene un electrodo de vidrio, el cual, genera una señal eléctrica proporcional al pH, según la ley de Nernst.

3.2.2. Determinación de sólidos solubles totales (°Brix)

El valor de °Brix corresponde a la tasa de sólidos en suspensión presentes en un zumo o pulpa. Para determinar los °Brix hemos usado un refractómetro digital de mano, llamado “Pocket” PAL- α de la marca ATAGO (Tokio, Japón). Este refractómetro es un modelo especial con una amplia gama de grados Brix (0-85%). El refractómetro se ha utilizado calibrando el cero con agua.



Figura 3.3. Refractómetro “Pocket” PAL- α .

3.2.3. Método de análisis (HPAEC-PAD)

Se ha analizado la presencia de azúcares en zumos, jarabes de glucosa y azúcar invertido, mediante cromatografía líquida de intercambio aniónico con detección amperométrica de pulsos (High Performance Anion Exchange Chromatography, HPAEC) con un cromatógrafo Metrohm (Madrid, España) equipado con una columna de intercambio aniónico metrosep-carb1 de 5 μ m de tamaño de partícula y dimensiones 150x4mm, termostaticada a 32°C, con NaOH 80 Mm como la fase móvil a un flujo de 0,7ml/min, 10 μ l de volumen de inyección y detección amperométrica por pulsos de 50mV (PAD).

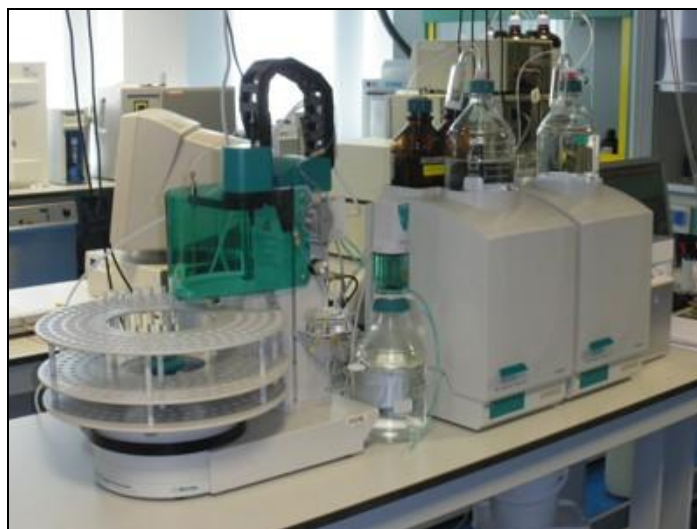


Figura 3.4. Cromatógrafo Metrohm (www.upct.es).

Preparación de la muestra. Los zumos concentrados y jarabes de azúcar se diluyen con agua x1000 y los zumos naturales, los zumos reconstituidos y los zumos comerciales son diluidos x200. Además, los zumos reconstituidos se analizan también con un factor de dilución x25. Posterior a la dilución se pasa la muestra por un filtro de 45 μ m antes de inyectarla en el cromatógrafo.

3.2.4. Determinación de viscosidad.

Se ha utilizado un viscosímetro Ostwald, éste viscosímetro se encuentra dentro de los viscosímetros capilares y la mayor característica de éstos tipo de viscosímetros es que están compuestos por un tubo muy delgado por el cual se mueve el fluido y dependiendo de la velocidad con que lo hace se mide su viscosidad.

El viscosímetro de Ostwald es de vidrio. Posee un ensanchamiento en forma de ampolla conectado a un tubo capilar vertical que se une a un segundo ensanchamiento.

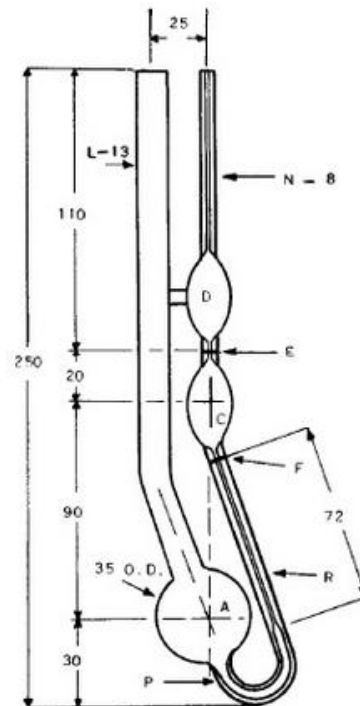


Figura 3.5. Viscosímetro Ostwald (www.es.scribd.com).

Éste viscosímetro está diseñado para dejar pasar a través del capilar un caudal constante de líquido mediante la aplicación de una fuerza reproducible. Esta fuerza se genera por la presión que ejerce la carga hidrostática debido a los diferentes niveles de las superficies líquidas en el mismo viscosímetro. La viscosidad cinemática de los zumos estudiados se ha determinado experimentalmente usando la siguiente ecuación:

$$V \text{ (cps)} = d \text{ (g/ml)} * C \text{ (m}^2\text{/s/s)} * t \text{ (s)}$$

Siendo, v , la viscosidad cinemática de la muestra, C , constante del viscosímetro, t , tiempo de caída y d , la densidad del zumo calculada con el picnómetro.

El valor de la constante “C” del viscosímetro utilizado es 0,018439 m²/s/s.

Análisis del perfil de azúcares en la autenticación de zumos de frutas

Materiales y Métodos

3.2.5. Determinación de la densidad.

El picnómetro o botella de gravedad específica, es un frasco con un cierre sellado de vidrio que dispone de un tapón provisto de un finísimo capilar, de tal manera que puede obtenerse un volumen con gran precisión. Esto permite medir la densidad de un fluido, en referencia a la de un fluido de densidad conocida como el agua o el mercurio.

Para llenar el picnómetro se quita el tapón esmerilado, que está hueco o perforado y se añade de muestra. El líquido subirá por el interior del tapón hasta el capilar. Puede ocurrir que incluso rebose, en cuyo caso se seca cuidadosamente por fuera.



Figura 3.6. Picnómetro. (es.wikipedia.org).

El método usado para calcular la densidad fue el siguiente:

- Primero se pesa el picnómetro vacío.
- En segundo lugar se llena el picnómetro de zumo y se pesa, asegurándose de que el líquido suba por el capilar.
- Luego se resta el peso del picnómetro lleno de zumo y el peso del picnómetro vacío, para poder obtener el peso del zumo en ese volumen.
- Por último podemos calcular la densidad ya que en el picnómetro tenemos su volumen constante (v):

$$\text{Densidad (Kg/L)} = \text{Peso del zumo (Kg)/Volumen (L)}$$

Análisis del perfil de azúcares en la autenticación de zumos de frutas

Materiales y Métodos

3.2.6. Determinación de la acidez valorable.

Lo primero que se hizo para calcular la acidez valorable fue preparar los reactivos: hidróxido sódico 0,25M y biftalato potásico 0,025M.

Posteriormente se realiza la factorización de la sosa, para ello se añadió NaOH en la bureta hasta llenarla y en un vaso se añadieron 20ml de biftalato potásico 0,025M con unas gotas de fenolftaleína. En el vaso fue cayendo la NaOH hasta que el biftalato del vaso viró a un color rosa. Esto nos indica que hemos ajustado el pH hasta 8,1. Se mide la NaOH gastada con la bureta y se realiza la siguiente operación:

$$\text{NaOH(N)} = (20\text{ml} \cdot 0,25\text{M}) / \text{ml de NaOH gastados}$$

Al realizar esta operación obtenemos el valor real de la normalidad de la NaOH. Una vez realizada la factorización ya podemos proceder a la realización de la determinación de la acidez valorable. Para realizarla seguimos los siguientes pasos:

1. Llenamos la bureta de NaOH.
2. Añadimos en un vaso 25 ml de zumo y unas gotas de fenolftaleína.
3. Vamos añadiendo NaOH al vaso que contiene el zumo hasta que el zumo vire a color rosa.
4. Una vez que ha virado se mide con la bureta el NaOH gastado.
5. A continuación se calcula la acidez valorable con la siguiente fórmula.

La acidez valorable, C_{H^+} , se expresa como los moles de H^+ por litro de zumo. Y se calcula con la siguiente fórmula:

$$C_{H^+} = (1000 \cdot V_{\text{NaOH}} \cdot c) / V_{\text{zumo}}$$

Donde:

- V_{NaOH} : es el volumen, en mililitros, de hidróxido sódico usado para la determinación de la acidez valorable.
- V_{zumo} : es el volumen, en mililitros, de la muestra de zumo, en éste caso el volumen de zumo fue 25 ml.
- C : es la concentración, en moles por litro, de la solución de hidróxido sódico.

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE CARTAGENA
ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA
AGRONÓMICA



PROYECTO FIN DE CARRERA
**Análisis del perfil de azúcares en la
autenticación de zumos de frutas**

Resultados y Discusión



4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Selección y puesta a punto de un método de análisis de perfiles de azúcares.

Lo primero que se realizó fue la optimización y puesta a punto del método de análisis por HPAE-PAD para la determinación de perfil de azúcares en zumos de frutas, jarabes de glucosa y azúcar invertido.

Como muestras para realizar ésta puesta a punto se tomaron 4 azúcares de jarabe de glucosa (los designados como: Z10, Z11, Z13 y Z15), tres zumos concentrados (de naranja, manzana y piña) y tres zumos comerciales (también de naranja, manzana y piña). La optimización de las condiciones de trabajo se hizo variando la concentración de NaOH en la fase móvil, el flujo y la dilución de las muestras; para buscar las mejores condiciones de análisis. La fase móvil se modificó entre 40mM y 120mM. Se observó que la concentración óptima de hidróxido sódico en la fase móvil es de 80mM. Respecto al flujo se ensayó en un rango desde 0,70ml/min hasta 1ml/min, los mejores resultados de análisis se obtuvieron a un flujo de 0,70ml/min.

Con respecto a la preparación de las muestras se estudió el efecto de la concentración de la muestra. Se trata de obtener un cromatograma que permita la detección e identificación de los distintos azúcares presentes en cada muestra. Para ello los jarabes de glucosa y los zumos concentrados se diluyeron x1000, x2000 y x4000, de estas tres diluciones los mejores resultados, en cuanto a detección y resolución, se obtuvieron con las muestras diluidas x1000, tanto para los zumos concentrados como para los jarabes de glucosa. Respecto a los zumos comerciales, se analizaron diluidos x200, x400 y x800. La dilución seleccionada en este caso fue x200.

Análisis del perfil de azúcares en la autenticación de zumos de frutas

Resultados y Discusión

Con estos resultados se concretaron unas condiciones óptimas de preparación de la muestra y de análisis:

- Los azúcares y los zumos concentrados se diluyen x1000, y los zumos comerciales y los naturales x200. Además, todas las muestras se filtran con un filtro de 0,45 μ m antes de ser analizadas, según se describe en materiales y métodos.
- Las condiciones de separación y detección de las muestras serán las siguientes: como fase estacionaria se usa una columna de intercambio aniónico metrosep-carb1 de 5 μ m de tamaño de partícula y dimensiones 150x4mm, termostaticada a 32°C. La fase móvil es NaOH 80 Mm a un flujo de 0,70ml/min, el volumen de muestra 10 μ l y el sistema de detección por amperometría de pulson con pulsos de 50mV (PAD).

4.2. Análisis de jarabes de glucosa y azúcares invertidos

Una vez optimizadas las condiciones de análisis se analizaron diferentes muestras de jarabe de glucosa y azúcar invertido, disponible en el mercado. Es de esperar que los azúcares invertidos contengan glucosa, fructosa y, dependiendo del grado de hidrólisis, una proporción mayor o menor de sacarosa. Los jarabes de glucosa, procedentes de la hidrólisis de almidón contienen glucosa y fructosa, procedente de la isomerización de glucosa y trazas de algunos disacáridos, principalmente maltosa. También es posible que contengan algún otro oligosacárido.

Se analizaron un total de diez muestras, designadas de la Z10 a la Z19. De ellas todas son jarabes de glucosa y fructosa excepto la muestra Z17 que es azúcar invertido, como queda recogido en la Tabla 4.1.

Análisis del perfil de azúcares en la autenticación de zumos de frutas

Resultados y Discusión

Tabla 4.1. Jarabes de glucosa y azúcares invertidos analizados.

Identificación	Características	° Brix
Z10	Jarabe de glucosa-fructosa	70.3
Z11	Isoglucosa	71.3
Z12	Jarabe de glucosa	
Z13	Jarabe de fructosa y glucosa F42	69.6
Z14	Jarabe de fructosa y glucosa F42	69.2
Z15	Jarabe de fructosa y glucosa F42	69.2
Z16	Jarabe de fructosa y glucosa F42	67.0
Z17	Jarabe de azúcar invertido F48	67
Z18	Jarabe de fructosa y glucosa F55	74.6
Z19	Jarabe de glucosa y fructosa F85	74

Todas las muestras se prepararon como se ha indicado anteriormente y se analizaron en las condiciones óptimas seleccionadas. Los cromatogramas obtenidos de cada muestra están recogidos en las Figuras 4.1 a la 4.10. En ellos se observa el perfil de azúcares obtenido para cada muestra analizada. Los compuestos identificados han sido glucosa, fructosa, sacarosa y maltosa.

La Figura 4.1 recoge el cromatograma de la muestra Z10 que procede de almidón hidrolizado, como lo demuestra la presencia de maltosa. Sin embargo también se observa sacarosa que no debía de estar presente. Este resultado se puede atribuir a la presencia de sacarosa como impureza o a la presencia de azúcar invertido que aporta glucosa, fructosa y sacarosa si no se ha hidrolizado por completo.

Análisis del perfil de azúcares en la autenticación de zumos de frutas

Resultados y Discusión

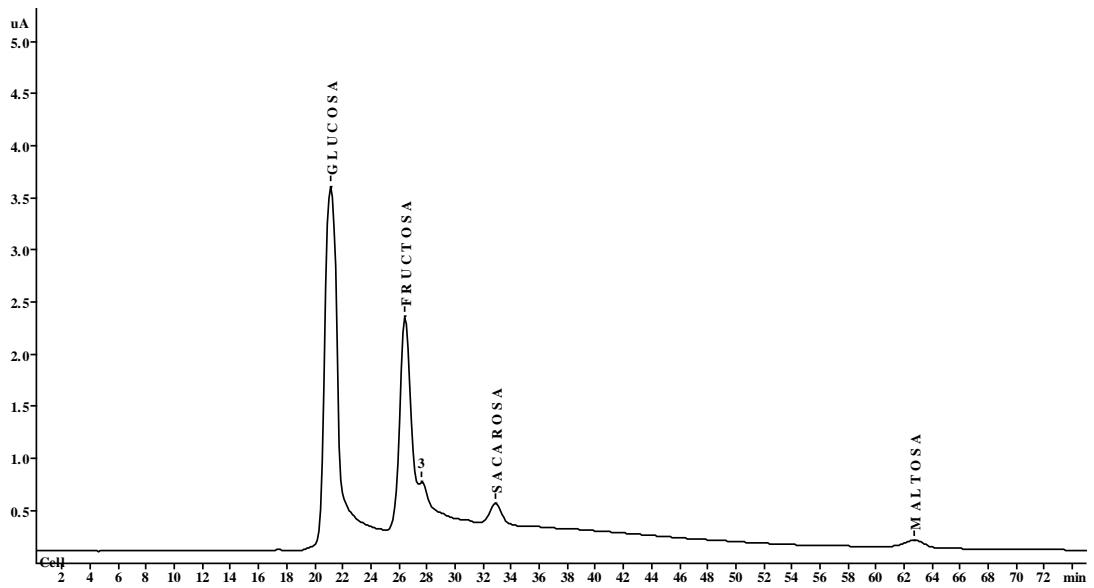


Figura 4.1. Perfil de azúcares de Z10.

La Figura 4.2 representa el cromatograma correspondiente a la muestra Z11 descrita como isoglucosa. Muestra un cromatograma característico de un almidón hidrolizado, donde parte de la glucosa se ha isomerizado a fructosa, y quedan restos de maltosa no hidrolizada ó dimerizada tras la hidrólisis. Coincide por tanto con la descripción de la muestra Z11 que es isoglucosa.

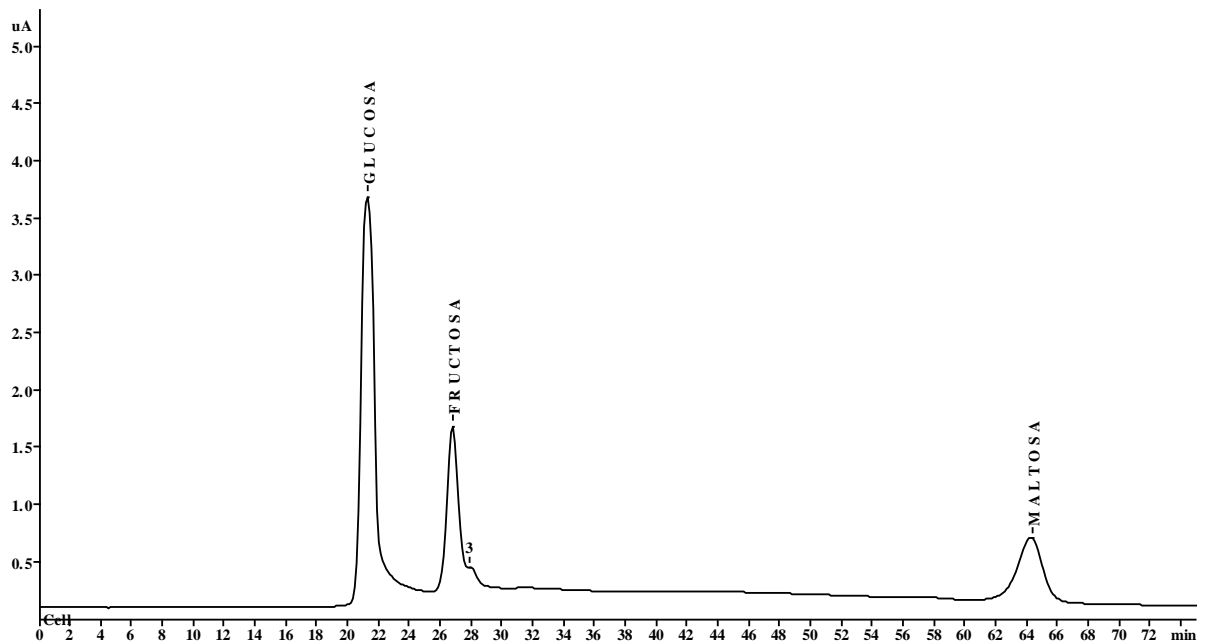


Figura 4.2. Perfil de azúcares de Z11.

Análisis del perfil de azúcares en la autenticación de zumos de frutas

Resultados y Discusión

La Figura 4.3 el cromatograma corresponde a una muestra descrita como jarabe de glucosa. La presencia de maltosa evidencia su origen a partir de almidón hidrolizado, el bajo contenido en fructosa indica que la isomerización de la glucosa ha sido muy débil. Sin embargo, la presencia de sacarosa no se puede explicar por su origen según esta descrito en sus especificaciones a partir de almidón. Al igual que sucede con la muestra Z10 (Figura 4.1) la presencia de sacarosa sólo se puede justificar por adición de este disacárido de modo intencionado ó accidental. El bajo contenido en fructosa hace pensar que puede contener sacarosa pero no azúcar invertido, ya que en ese caso la presencia de fructosa sería mayor.

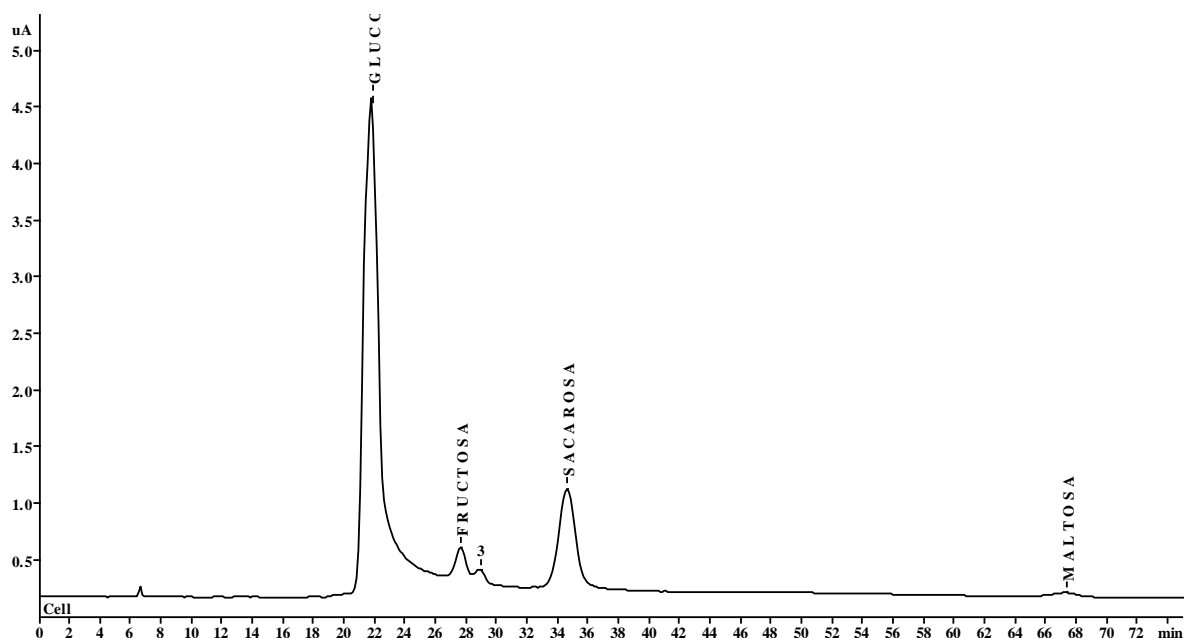


Figura 4.3. Perfil de azúcares de Z12.

Las Figuras 4.4 a la 4.7 muestran los cromatogramas de las muestras Z13 a Z16 descritas como jarabes de glucosa y fructosa F42 (Tabla 4.1). La nomenclatura F42 hace referencia al contenido relativo en fructosa. En los cuatro casos los cromatogramas obtenidos son los típicos de jarabes de glucosa. La presencia de maltosa justifica su origen de almidón y la fructosa la isomerización de glucosa en fructosa, no hay trazas de sacarosa como es de esperar en productos obtenidos a partir de almidón.

Análisis del perfil de azúcares en la autenticación de zumos de frutas
Resultados y Discusión

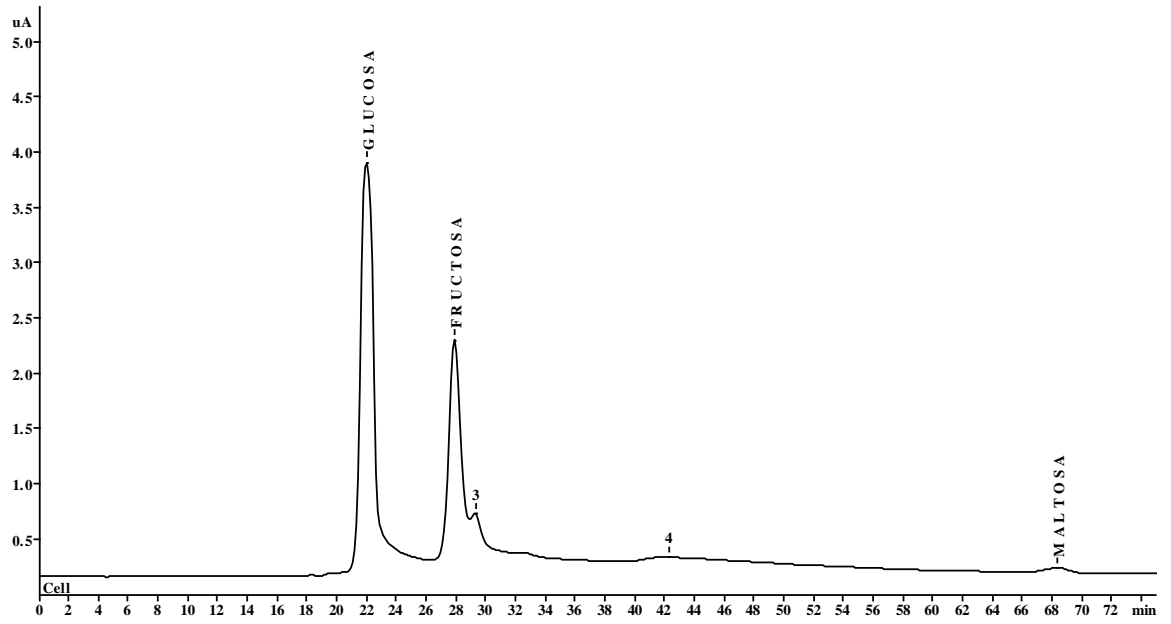


Figura 4.4. Perfil de azúcares de Z13.

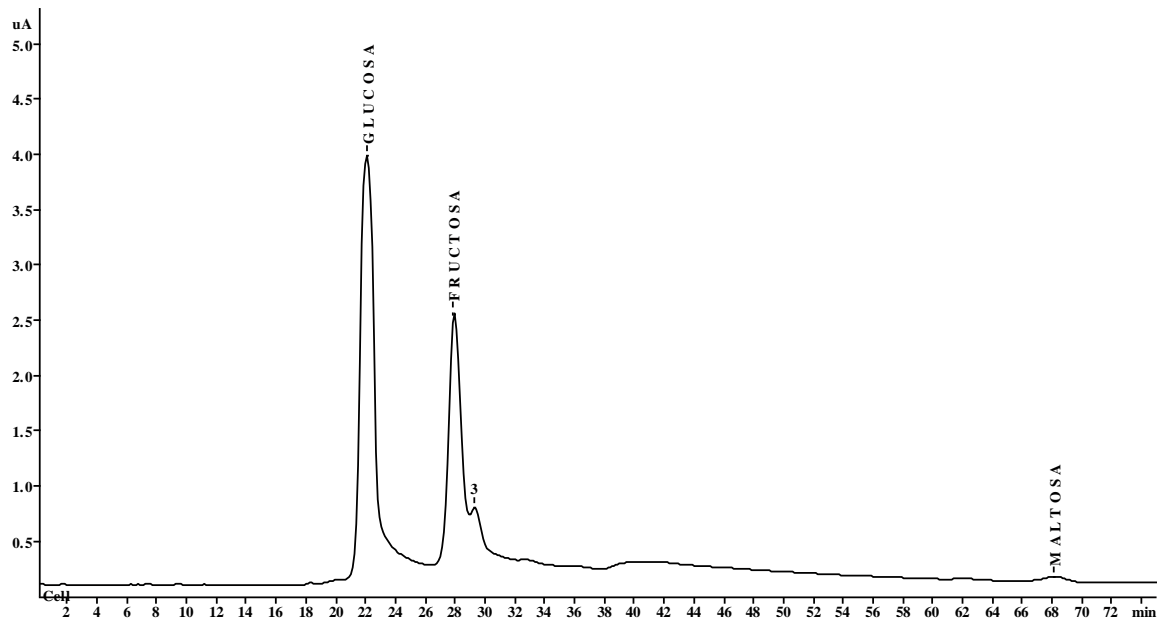


Figura 4.5. Perfil de azúcares de Z14.

Análisis del perfil de azúcares en la autenticación de zumos de frutas

Resultados y Discusión

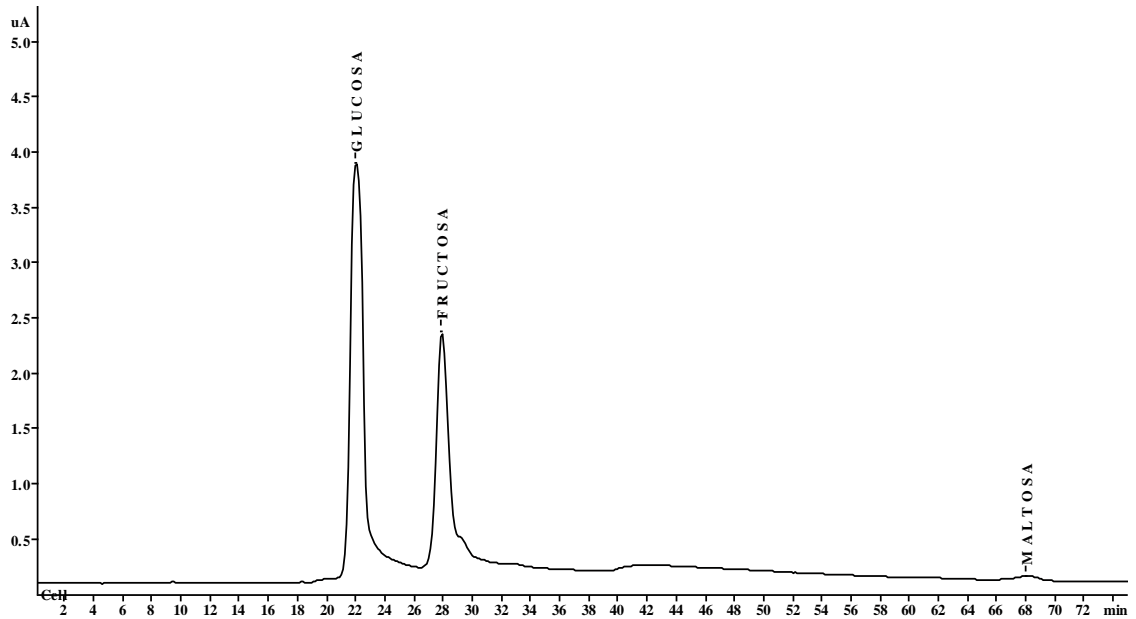


Figura 4.6. Perfil de azúcares de Z15.

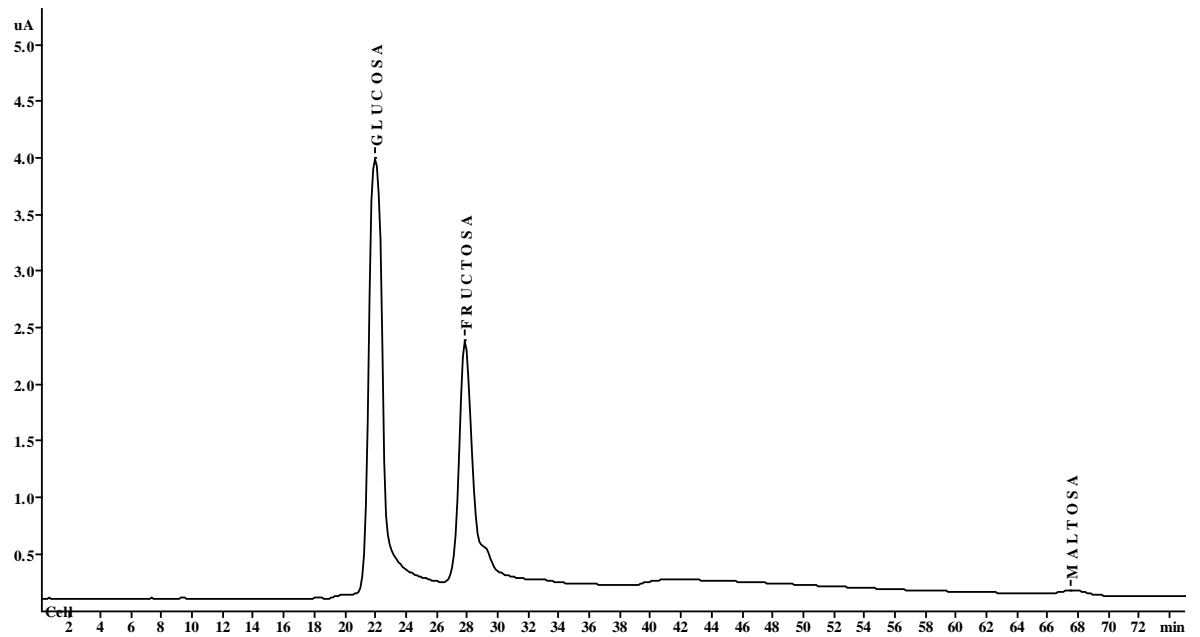


Figura 4.7. Perfil de azúcares de Z16.

La Figura 4.8 recoge el cromatograma del único azúcar invertido analizado. En él se aprecian los picos de glucosa y fructosa y trazas de sacarosa. La cantidad de sacarosa tan pequeña demuestra un alto grado de hidrólisis. La ausencia de maltosa prueba que este azúcar no procede de almidón.

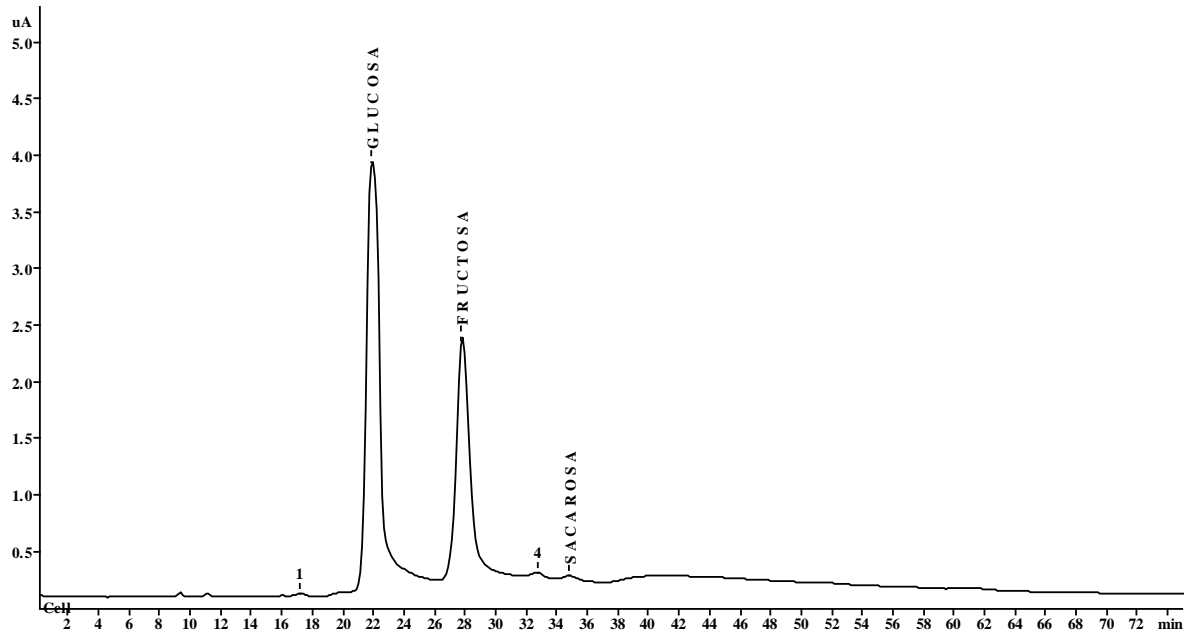


Figura 4.8. Perfil de azúcares de Z17.

Las Figuras 4.9 y 4.10 representan los cromatogramas de las muestras Z18 y Z19, correspondientes a azúcares producidos a partir de almidón con distinto grado de isomerización de glucosa en fructosa. La muestra Z18, designada como F55 debe tener un contenido en fructosa menor que la muestra Z19 designada como F85. En la Figura 4.9 correspondiente a la muestra Z18 se observan los picos correspondientes a glucosa y fructosa, trazas de maltosa y nada de sacarosa, como corresponde a su origen de almidón hidrolizado. En el cromatograma de la muestra Z19 (Figura 4.10) se observan los picos correspondientes a glucosa y fructosa. El pico de fructosa es mayor que en la muestra Z18 (Figura 4.9) como es de esperar según las especificaciones de cada producto. La muestra Z19 tiene el mayor contenido en fructosa de todos los azúcares analizados, coincidiendo con su descripción como F85. Sin embargo no se detectan trazas de maltosa, es el único jarabe de glucosa que no presenta maltosa.

Análisis del perfil de azúcares en la autenticación de zumos de frutas

Resultados y Discusión

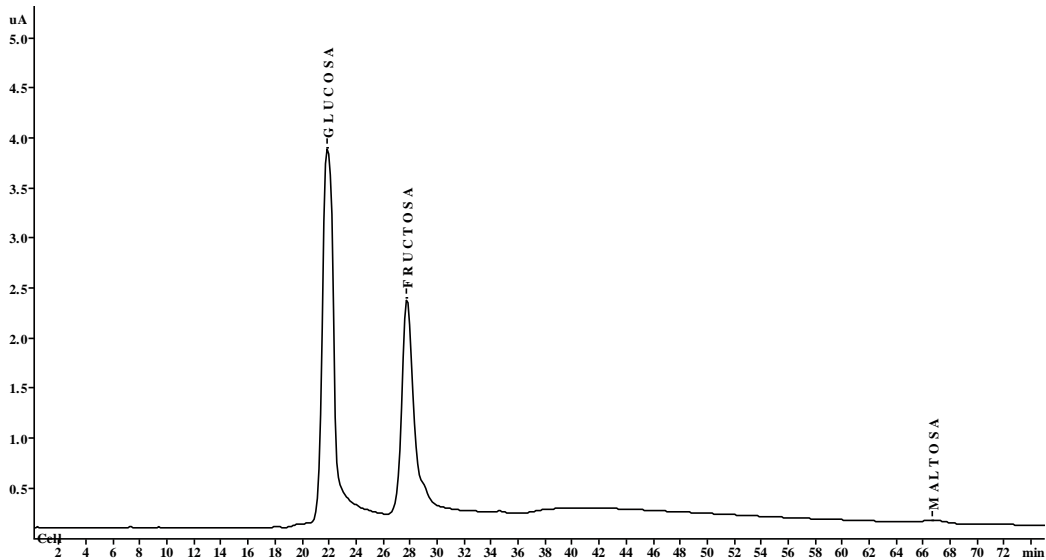


Figura 4.9. Perfil de azúcares de Z18.

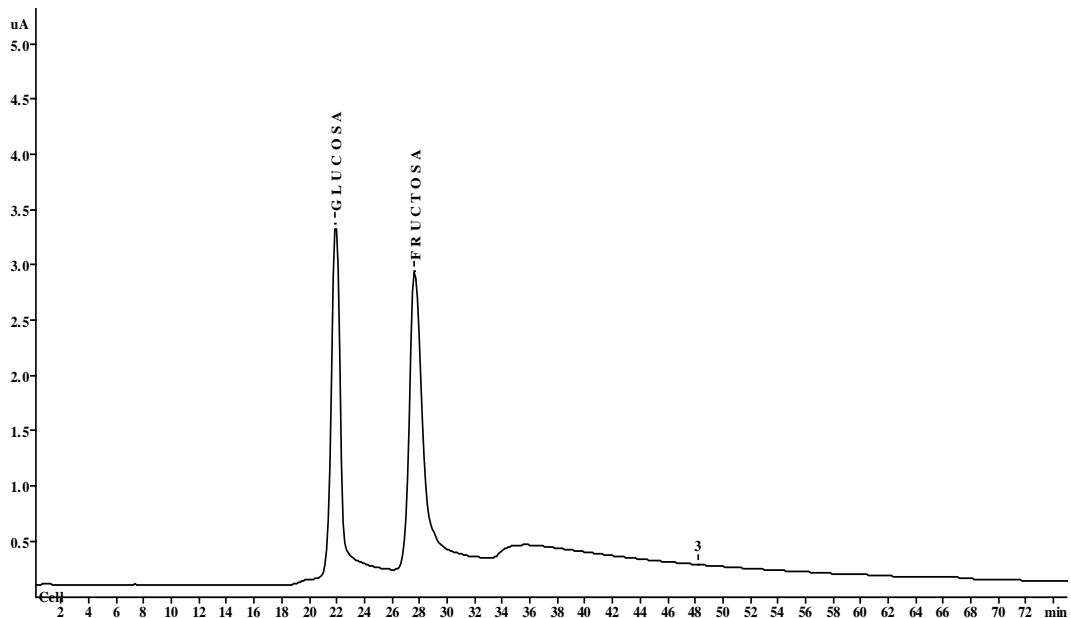


Figura 4.10. Perfil de azúcares Z19.

Continuando con los resultados de estos análisis, la Tabla 4.2 muestra los datos extraídos de los cromatogramas: tiempos de retención, porcentaje de área correspondiente a cada compuesto en el cromatograma, y las relaciones de área entre los distintos azúcares presentes. Estos últimos valores se obtuvieron a fin de establecer además del perfil de azúcares una relación entre los distintos azúcares presentes en cada muestra, ya que la relación de azúcares se puede usar junto con el perfil de azúcares como criterio de autenticación.

Análisis del perfil de azúcares en la autenticación de zumos de frutas
Resultados y Discusión

Tabla 4.2. Tiempos de retención, porcentajes de área y relación de azúcares en los jarabes de glucosa y azúcares invertidos estudiados.

Azúcar		Glucosa	Fructosa	Sacarosa	Maltosa	
tr (min)		21.73	27.49	34.04	66.60	
Producto comercial	Características					Glc/Fruc
Z10	Jarabe de glucosa-fructosa	55.654%	29.06%	3.327%	2.036%	1.915
Z11	Isoglucosa	59.323%	21.013%	-	16.868%	2.823
Z12	Jarabe de glucosa	72.575%	5.827%	16.229%	0.996%	12.455
Z13	Jarabe de fructosa y glucosa F42	54.818%	27.128%	--	1.176%	2.021
Z14	Jarabe de fructosa y glucosa F42	55.858%	29.082%	--	0.968%	1.921
Z15	Jarabe de fructosa y glucosa F42	59.151%	39.73%	--	1.118%	1.489
Z16	Jarabe de fructosa y glucosa F42	60.322%	39.012%	--	0.666%	1.546
Z17	Jarabe de azúcar invertido F48	62.686%	35.854%	0.56%	-	1.748
Z18	Jarabe de fructosa y glucosa F55	60.209%	39.012%	-	0.779%	1.543
Z19	Jarabe de glucosa y fructosa F85	45.196%	54.804%	-	-	0.825

En principio la sacarosa debía estar presente solo en la muestra Z17 que es un azúcar invertido. Sin embargo también se observa sacarosa en las muestras Z10 y Z12 como ya se ha comentado. Respecto a la maltosa debería aparecer en todas las muestras de jarabe de glucosa, es decir, todas las muestras analizadas excepto la Z17. Esto se cumple para todas las muestras menos para la Z19, ya que tiene un alto grado de isomerización y no presenta maltosa. Si nos fijamos en la relación Glucosa/Fructosa, todos están en el rango entre 1,48 de Z15 y 2,82 de Z11, excepto Z12 que es un jarabe de glucosa pobre en fructosa, que además de maltosa, contiene sacarosa y

Análisis del perfil de azúcares en la autenticación de zumos de frutas

Resultados y Discusión

muestra una relación Glucosa/Fructosa del orden de 6 veces mayor que los demás azúcares estudiados. Esta observación lleva a pensar que se trata de una mezcla de jarabe de glucosa de baja isomerización y sacarosa poco o nada hidrolizada. Respecto a la muestra Z19 la relación de Glucosa/Fructosa es de 0,82, la más baja de todas. Esto coincide con sus características de jarabe de glucosa con alto grado de isomerización (F85).

De los resultados recogidos en la Tabla 4.2 se observa cómo en general a partir de almidón hidrolizado e isomerizado se obtiene una relación Glucosa/Fructosa del mismo orden que la que se obtiene mediante la hidrólisis o inversión de la sacarosa.

4.3. Perfiles de azúcares de zumos concentrados.

Tras el análisis de azúcares se procedió a analizar los zumos concentrados de naranja, manzana y piña. Estos productos se emplean habitualmente en las industrias para la elaboración de zumos a base de concentrado. Para su análisis cada uno de los tres zumos se diluyó por un factor de 1000 con agua, se filtró por un filtro de 0,45 μ m, y se analizó por HPAEC-PAD según el procedimiento descrito.

La Figura 4.11 muestra el cromatograma del perfil de azúcares del zumo concentrado de naranja. En este cromatograma se observa a los 6.5 minutos un pico que se ha identificado como mioinositol éste es un compuesto propio de la naranja, que está presente en los cítricos en general y también en otros vegetales. Más tarde eluyen glucosa, fructosa y sacarosa con tiempos de retención similares a los obtenidos en el análisis de azúcares para estos mismos compuestos.

Análisis del perfil de azúcares en la autenticación de zumos de frutas

Resultados y Discusión

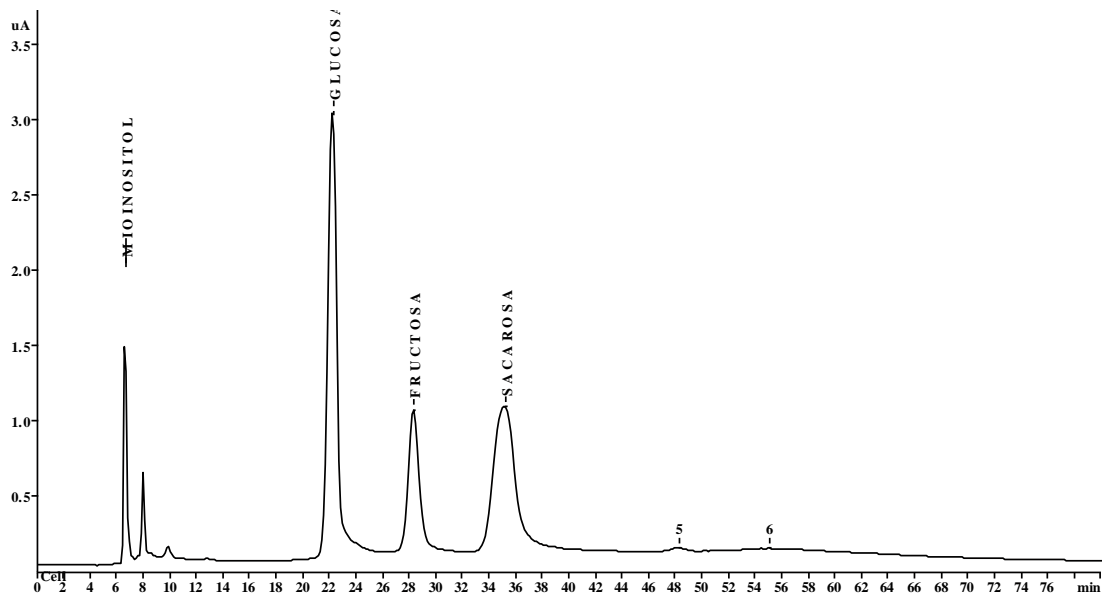


Figura 4.11. Perfil de azúcares de zumo concentrado de naranja.

La Figura 4.12 recoge el cromatograma del perfil de azúcares del zumo concentrado de manzana. En este cromatograma vemos a los 12.21 minutos el pico del sorbitol que como ya hemos comentado es un azúcar alcohol presente de forma natural en algunas frutas como manzanas, peras y albaricoques (Silva et al.; 1999). Al igual que en la naranja aparecen los azúcares glucosa, fructosa y sacarosa.

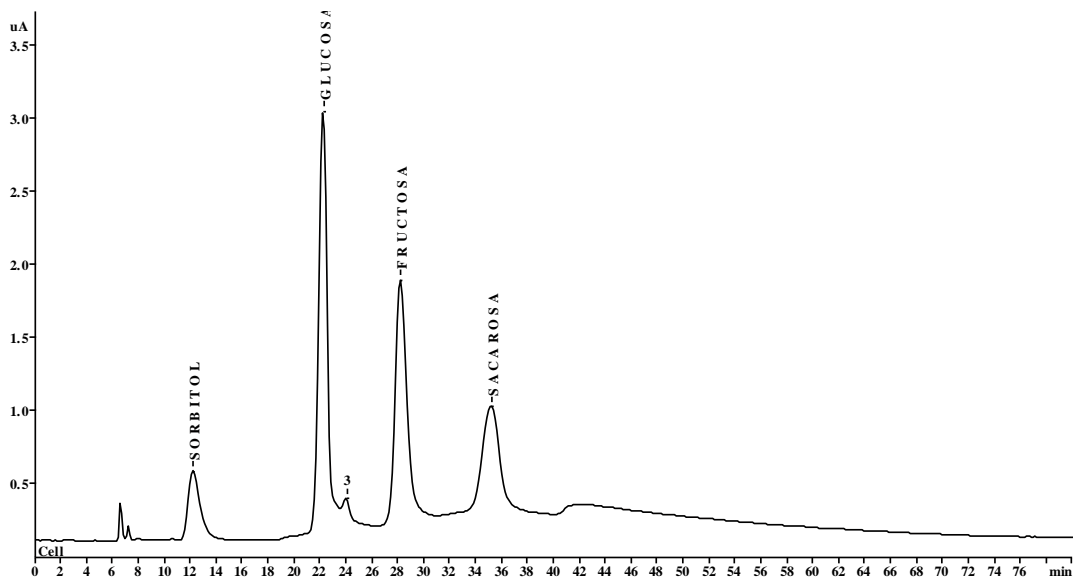


Figura 4.12. Perfil de azúcares de zumo concentrado de manzana.

Análisis del perfil de azúcares en la autenticación de zumos de frutas

Resultados y Discusión

El perfil de azúcares del zumo concentrado de piña está representado en la Figura 4.13. En este cromatograma nos encontramos sólo los tres picos correspondientes a los tres azúcares descritos en este zumo y que habitualmente tienen todas las frutas, estos son: glucosa, fructosa y sacarosa.

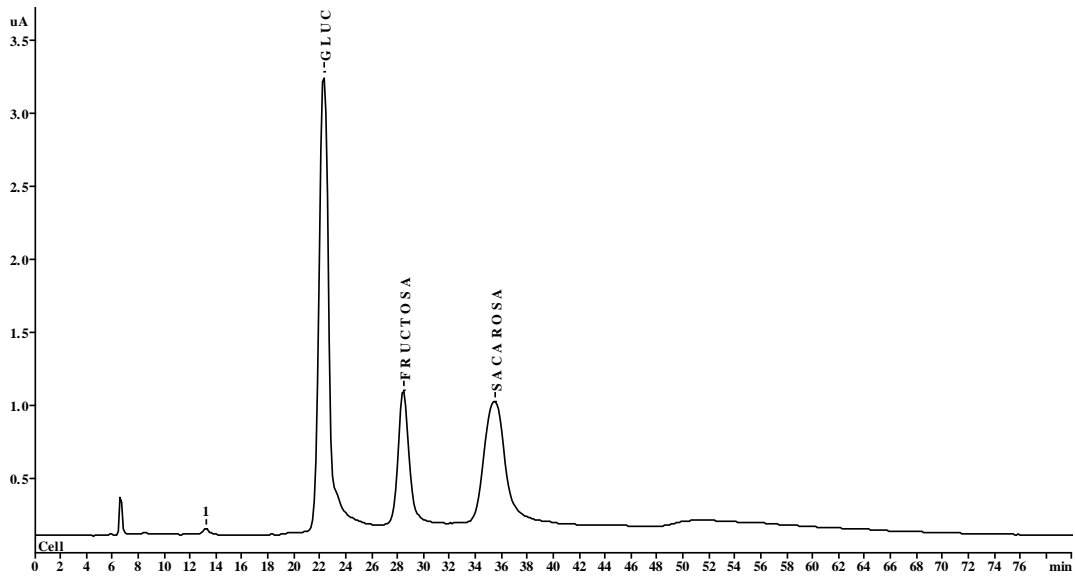


Figura 4.13. Perfil de azúcares de zumo concentrado de piña.

Los perfiles de azúcares obtenidos permiten diferenciar fácilmente una fruta de otra ya que la naranja tiene mioinositol, la manzana sorbitol y la piña no tiene ningún componente propio que la caracterice.

La Tabla 4.3 muestra los resultados de los análisis por HPAEC-PAD de los zumos concentrados. Se han recogido los tiempos de retención, los porcentajes de área de cada pico y la relación de azúcares al igual que en la Tabla 4.2, en este caso no aparece la maltosa ya que éste no es un azúcar presente de forma natural en las frutas, se detecta sin embargo el sorbitol en el zumo de manzana y el mioinositol en la naranja. El azúcar que aparece en mayor proporción en los tres zumos concentrados es la glucosa y sobre todo en la piña, ya que su proporción es mayor que en los demás zumos concentrados. Así, la relación glucosa/fructosa es mayor en la piña, seguido de la naranja, con la manzana en tercer lugar. La fructosa está en mayor concentración en la manzana que en la naranja y la piña, mientras que la naranja tiene un mayor contenido en sacarosa seguido de la piña y la manzana

Análisis del perfil de azúcares en la autenticación de zumos de frutas

Resultados y Discusión

en tercer lugar. Si se comparan las relaciones fructosa/sacarosa la mayor es para la manzana, después la piña y la naranja, con valores muy próximos.

Tabla 4.3. Tiempos de retención, porcentajes de área y relación de azúcares en los zumos concentrados de naranja, manzana y piña.

Azúcar	Mioi- nositol	Sorbitol	Glucosa	Fructosa	Sacarosa			
tr (min)	6.5	12.21	21.73	27.49	34.04			
Zumo						Glc/Fru	Glc/Sac	Fru/Sac
Naranja	7.441%	-	41.068%	17.999%	33.317%	2,282	1,233	0,54
Manzana	-	8.317%	38.396%	29.273%	20.409%	1,312	1,881	1,434
Piña	-	-	52.472%	17.689%	29.456%	2,966	1,781	0,6

De estos análisis se observa que por el perfil de azúcares es sencillo reconocer un zumo de naranja, por la presencia de mioinositol. El perfil del zumo de manzana se caracteriza por la el pico de sorbitol. Mientras que la piña no tiene un compuesto característico en su perfil de azúcares.

4.4. Análisis del perfil de azúcares en zumos naturales.

Además de los zumos concentrados, también se analizaron zumos de naranja, manzana y piña obtenidos en el laboratorio a partir de fruta fresca. El objetivo ha sido comparar el perfil de azúcares entre los zumos concentrados y los naturales recién obtenidos. Los análisis se realizaron preparando las muestras de manera similar a las anteriores pero diluyendo x200 en lugar de x1000 antes de filtrar y analizar la muestra.

Respecto a los cromatogramas de los zumos naturales mostrados en las Figuras 4.14, 4.15 y 4.16 decir lo mismo que hemos comentado con los cromatogramas de los zumos concentrados. Como se observa, se puede determinar y autenticar el origen de cada zumo según su cromatograma. Así, los tres zumos contienen glucosa, fructosa y sacarosa, pero el zumo de naranja contiene mioinositol como compuesto característico, el de manzana contiene sorbitol y la piña no muestra ningún compuesto exclusivo de esta fruta.

Análisis del perfil de azúcares en la autenticación de zumos de frutas

Resultados y Discusión

Si se comparan los cromatogramas de los zumos naturales con los de los concentrados observamos que en el zumo de naranja natural hay más sacarosa que en el concentrado. Al contrario de lo que se observa en el zumo de manzana, donde sacarosa y sorbitol dan picos más pequeños en el zumo natural cuando éstos se comparan con los picos de glucosa y fructosa. En cuanto a la piña natural se observa un pico mayor para la sacarosa en el zumo fresco que en el concentrado al igual que ocurre con la naranja.

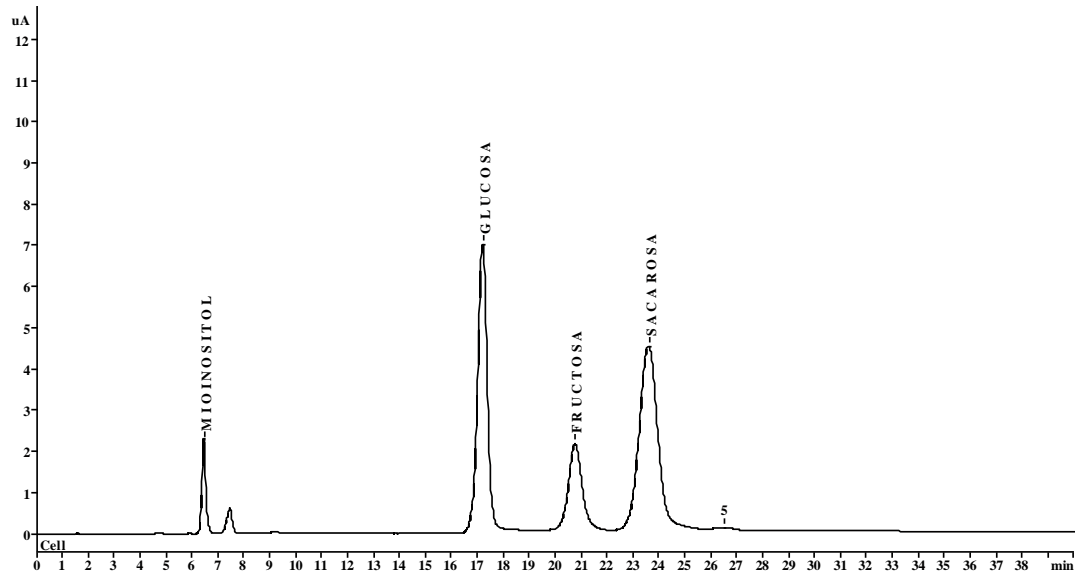


Figura 4.14. Perfil de azúcares de zumo natural de naranja.

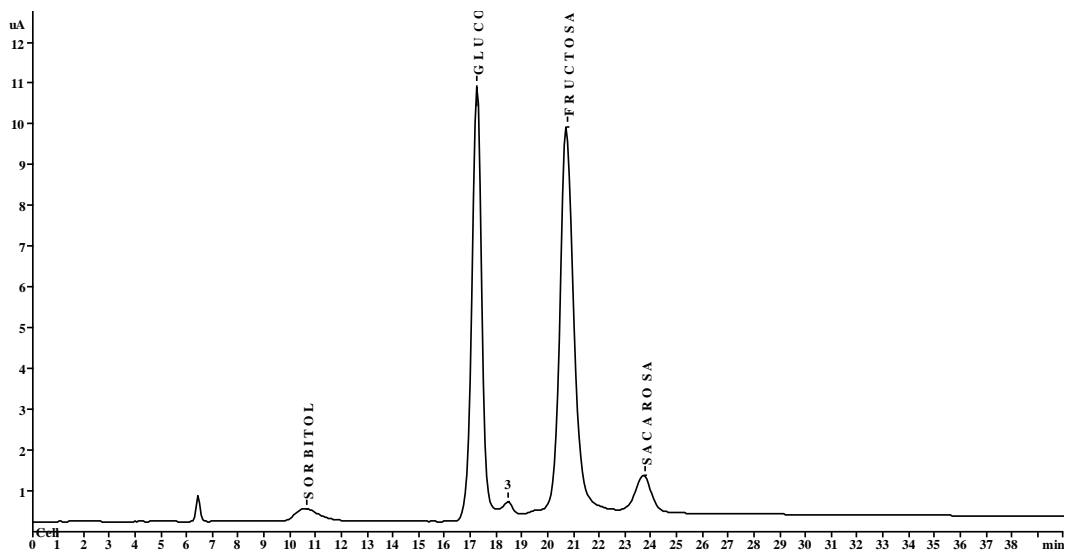


Figura 4.15. Perfil de azúcares de zumo natural de manzana.

Análisis del perfil de azúcares en la autenticación de zumos de frutas

Resultados y Discusión

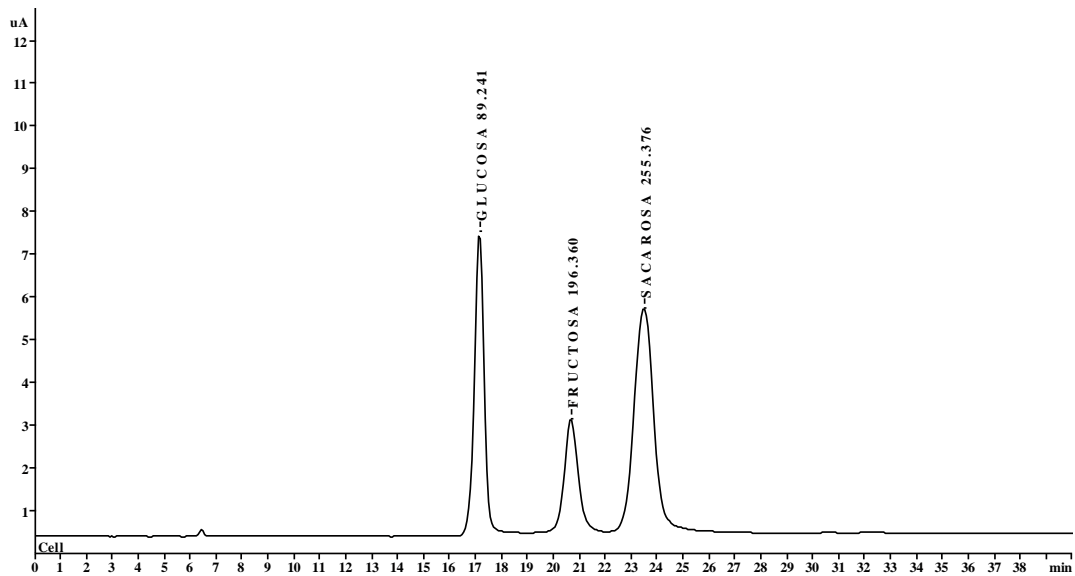


Figura 4.16. Perfil de azúcares de zumo natural de piña.

La Tabla 4.4 muestra los datos obtenidos de los cromatogramas. Se han recogido los tiempos de retención, porcentaje de área de cada compuesto y relación de azúcares.

Tabla 4.4. Porcentajes de área y relación de azúcares en zumos naturales estudiados.

Azúcar	Mio inositol	Sorbitol	Glucosa	Fructosa	Sacarosa			
tr (min)	6.5	12.33	21.73	27.49	34.04			
Zumo						Glc/Fru	Glc/Sac	Fru/Sac
Naranja	2,188%	-	36,369%	17,103%	45,372%	2,126	0,801	0,377
Manzana	-	2,248%	36,923%	50,969%	7,76%	0,724	4,758	6,568
Piña	-	-	31,993%	18,773%	49,234%	1,704	0,65	0,381

Si comparamos estos datos con los de la Tabla 4.3 de zumos concentrados vemos que los compuestos de cada zumo son los mismos pero los porcentajes de áreas y las relaciones de azúcares varían. Como ya se ha descrito en la observación de los cromatogramas. Estas variaciones se pueden atribuir a las variedades de frutas empleadas que no coinciden con las de los zumos concentrados y también al estado de maduración en el que se encuentre la fruta. Así se observa en la naranja como la relación Glucosa/Fructosa es parecida pero las relaciones Glucosa/Sacarosa y Fructosa/Sacarosa son distintas por el mayor porcentaje de sacarosa del zumo fresco. En la manzana las relaciones de azúcares son muy diferentes en el

Análisis del perfil de azúcares en la autenticación de zumos de frutas

Resultados y Discusión

zumo fresco respecto al zumo concentrado debido probablemente a que se trate de variedades de manzana diferentes. El zumo fresco tiene un contenido en sacarosa menor que el zumo concentrado. En cuanto a la piña, se observan variaciones en las tres relaciones de azúcares. En conjunto comparando los zumos concentrados con los naturales, se observa que se puede autenticar cada zumo por su perfil de azúcares pero no por la relaciones de azúcares que presentan ya que estas se ven influidas por distintos factores, entre ellos la variedad y el estado de maduración.

4.5. Análisis de zumos reconstituidos.

Una vez conocidos el perfil de azúcares de los jarabes de glucosa, zumos concentrados y naturales se procedió a construir los sistemas modelo de zumos reconstituidos a partir de zumo concentrado con distintos jarabes de glucosa añadidos. El objetivo fue comprobar si con el método de análisis para determinar el perfil de azúcares se pueden detectar los azúcares añadidos a un zumo elaborado a partir de concentrado.

Preparando los zumos como se describe en materiales y métodos se obtuvieron 12 zumos reconstituidos, 4 de naranja, 4 de manzana y 4 de piña. A cada uno de estos 4 zumos de naranja se le añadió un jarabe de glucosa diferente, y lo mismo se hizo con los zumos de manzana y los de piña. De los 10 azúcares analizados se seleccionaron 4 jarabes de glucosa (Z13, Z14, Z15 Y Z16, los que tienen la calificación F42) para obtener los zumos reconstituidos.

Para comprobar la bondad del método en la detección de azúcares añadidos, los zumos reconstituidos se analizaron a dos diluciones diferentes, una fue x25 y la otra x200. En los análisis habituales de zumos estos suelen diluirse por un factor de 1000. La dilución x25 permite detectar la presencia de maltosa pero glucosa, fructosa y sacarosa salen con los picos solapados ya que la concentración de la muestra es muy grande y la columna no tiene capacidad para separar correctamente los distintos compuestos. La maltosa se puede detectar por su elevado tiempo de retención que la hace salir varios minutos después que el resto de azúcares. La dilución x200 da un

Análisis del perfil de azúcares en la autenticación de zumos de frutas

Resultados y Discusión

cromatograma con el perfil de azúcares del zumo pero la maltosa presente en el jarabe de glucosa añadido quedará a una concentración tan baja que no se detecta. La presencia de maltosa evidencia la adición de jarabe de glucosa. En las condiciones habituales de análisis, diluyendo la muestra de zumo x1000 la maltosa pasaría desapercibida.

Las Figura 4.17 a 4.20 recogen los cromatogramas de los zumos de naranja reconstituidos. Cada Figura representa el cromatograma correspondiente a la muestra diluida x200, y en un inserto en cada Figura se incluye el cromatograma de la misma muestra diluida x25. Podemos ver como los perfiles cromatográficos de los zumos reconstituidos diluidos x200 y diluidos x25 son muy diferentes. El perfil de la muestra diluida x25 muestra bien resueltos los picos correspondientes al mioinositol y la maltosa, la glucosa no termina de resolverse bien y los picos de fructosa y sacarosa salen solapados y sin una clara separación. Esta dilución nos permite determinar que el zumo es de naranja, por la presencia de mioinositol, y también que se le ha añadido jarabe de glucosa, como lo demuestra la detección de maltosa.

En las muestras diluidas x200 no se detecta maltosa, por lo que en un análisis rutinario en el que el zumo suele diluirse x1000 la maltosa puede no verse y no se detectaría la adición de azúcar.

Análisis del perfil de azúcares en la autenticación de zumos de frutas

Resultados y Discusión

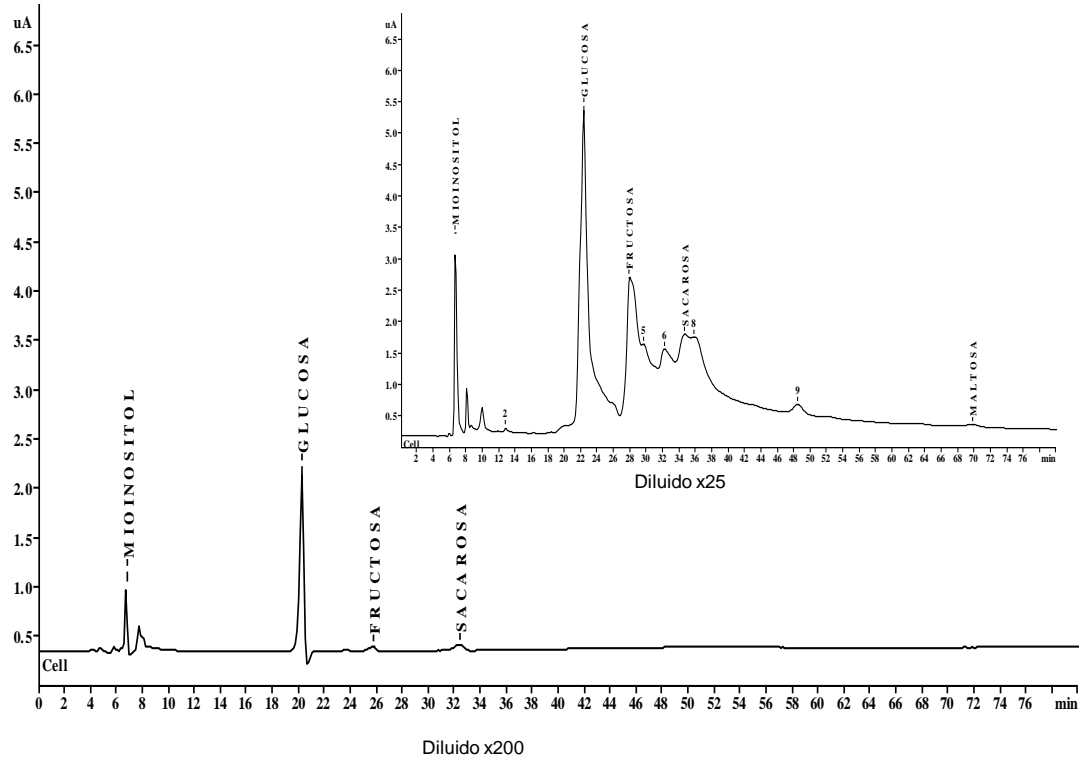


Figura 4.17. Perfil de azúcares de zumo reconstituido de naranja con jarabe de glucosa (Z13).

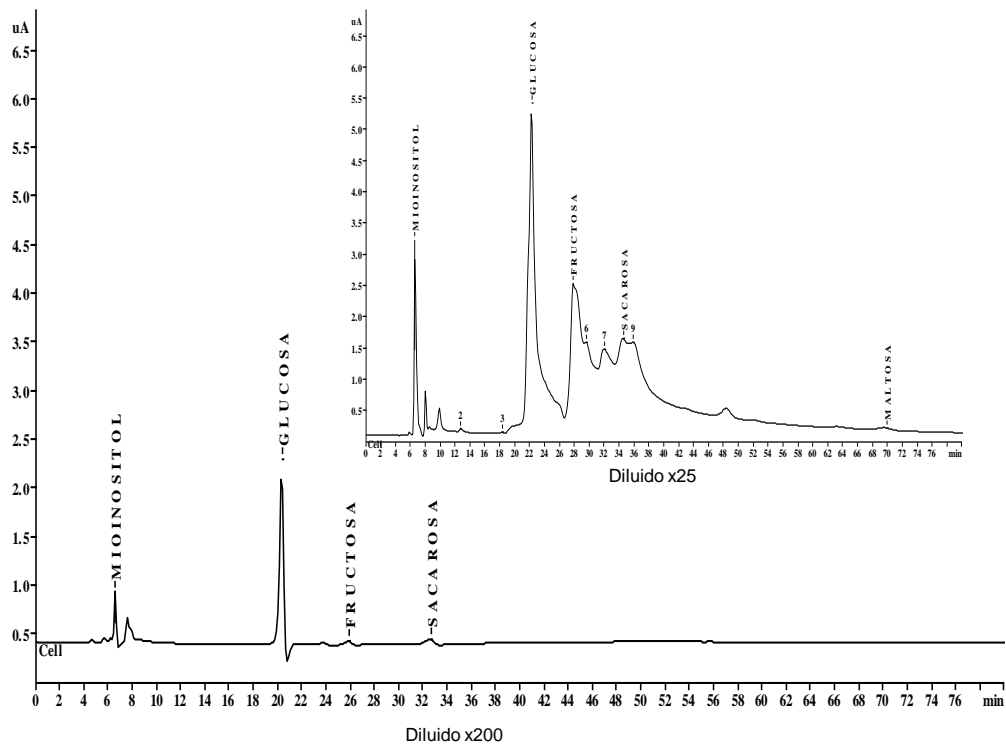


Figura 4.18. Perfil de azúcares de zumo reconstituido de naranja con jarabe de glucosa (Z14).

Análisis del perfil de azúcares en la autenticación de zumos de frutas

Resultados y Discusión

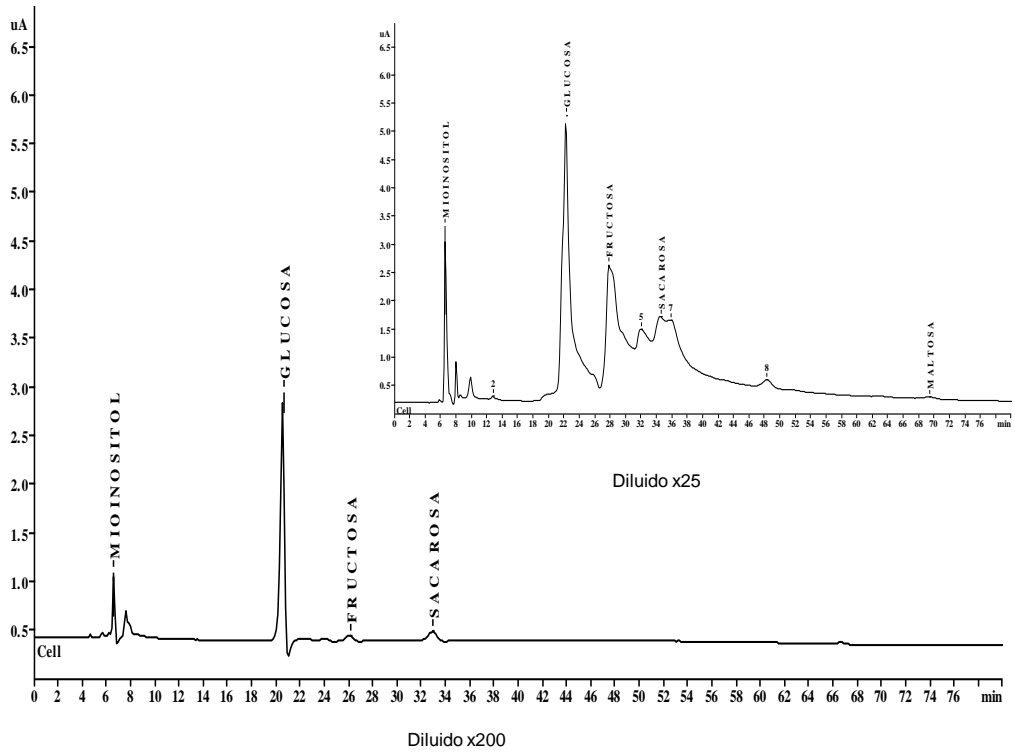


Figura 4.19. Perfil de azúcares de zumo reconstituido de naranja con jarabe de glucosa (Z15).

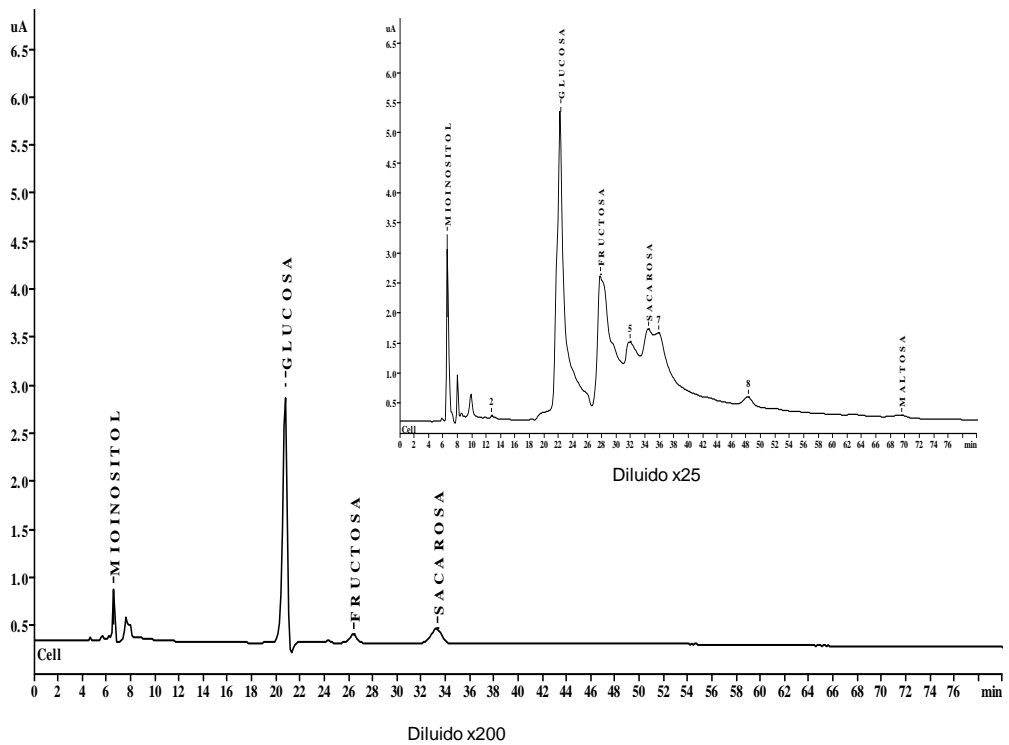


Figura 4.20. Perfil de azúcares de zumo reconstituido de naranja con jarabe de glucosa (Z16).

Análisis del perfil de azúcares en la autenticación de zumos de frutas

Resultados y Discusión

La Tabla 4.5 muestra los resultados de los análisis por HPAEC-PAD de los zumos de naranja reconstituidos diluidos x200. Al igual que en los estudios anteriores se han recogido los datos de tiempo de retención, porcentaje de área correspondiente a cada compuesto en el cromatograma, y se han calculado las relaciones de área entre los distintos azúcares presentes.

Comparando estos resultados con los del zumo concentrado y natural de naranja recogidos en las Tablas 4.3 y 4.4, se observa como varían los porcentajes de áreas y las relaciones de azúcares: Glucosa/Fructosa y Glucosa/Sacarosa, la relación Fructosa/Sacarosa varía menos. La relación glucosa/fructosa en el zumo concentrado es de 2,26 y en el natural de 2,13. Aquí los valores oscilan entre 16,8 y 29, es decir, del orden de 10 veces superior. La relación glucosa/sacarosa también sería unas 10 veces superior y solo la relación fructosa/sacarosa mantiene unos valores parecidos a los del zumos concentrado y natural. Aquí un análisis rutinario si puede evidenciar la adición de azúcares al zumo reconstituido por la diferente relación de azúcares encontrada. De los cuatro sistemas modelo de zumos reconstituidos el que más se podría parecer al zumo de naranja concentrado sería el zumo de naranja reconstituido con Z16, ya que es el que tiene unos valores de porcentaje de área y relaciones de azúcares más bajos, pero aún difieren mucho con el zumo concentrado de partida.

Tabla 4.5. Tiempos de retención, porcentajes de área y relación de azúcares en zumos de naranja reconstituidos.

Azúcar	Mioinositol	Glucosa	Fructosa	Sacarosa			
tr (min)	6.5	21.73	27.49	34.04			
Zumo					Glc/Fru	Glc/Sac	Fru/Sac
Naranja + Z13 Dil. x200	11,95%	77,82%	3,496%	6,682%	22,24	11,645	0,523
Naranja + Z14 Dil. x200	15,068%	77,350%	2,668%	4,883%	28,996	15,842	0,546
Naranja + Z15 Dil. x200	11,6%	78,115%	3,265%	7,02%	23,921	11,126	0,465
Naranja + Z16 Dil. x200	10,70%	74,843%	4,443%	10,014%	16,846	7,474	0,444

Análisis del perfil de azúcares en la autenticación de zumos de frutas

Resultados y Discusión

Así, a partir de los resultados de este estudio observamos que en un análisis rutinario con el zumo diluido x1000, aunque la maltosa no se detecte, si que se observa un incremento de glucosa que modifica las relaciones de azúcares más de lo que sería esperado o más de lo que se podría justificar considerando el origen o estado de madurez diverso del zumo de partida. Es decir el análisis por HPAED-PAD con independencia de la dilución de la muestra permite detectar azúcares añadidos porque se altera de manera significativa la relación de azúcares.

Las Figuras de la 4.21 a la 4.24 recogen los cromatogramas correspondientes al perfil de azúcares obtenido para los zumos de manzana reconstituidos analizados diluyendo las muestras x200 y x25. Los ensayos se han hecho al igual que con el zumo de naranja adicionando 4 jarabes de glucosa correspondientes a Z13, Z14, Z15 y Z16.

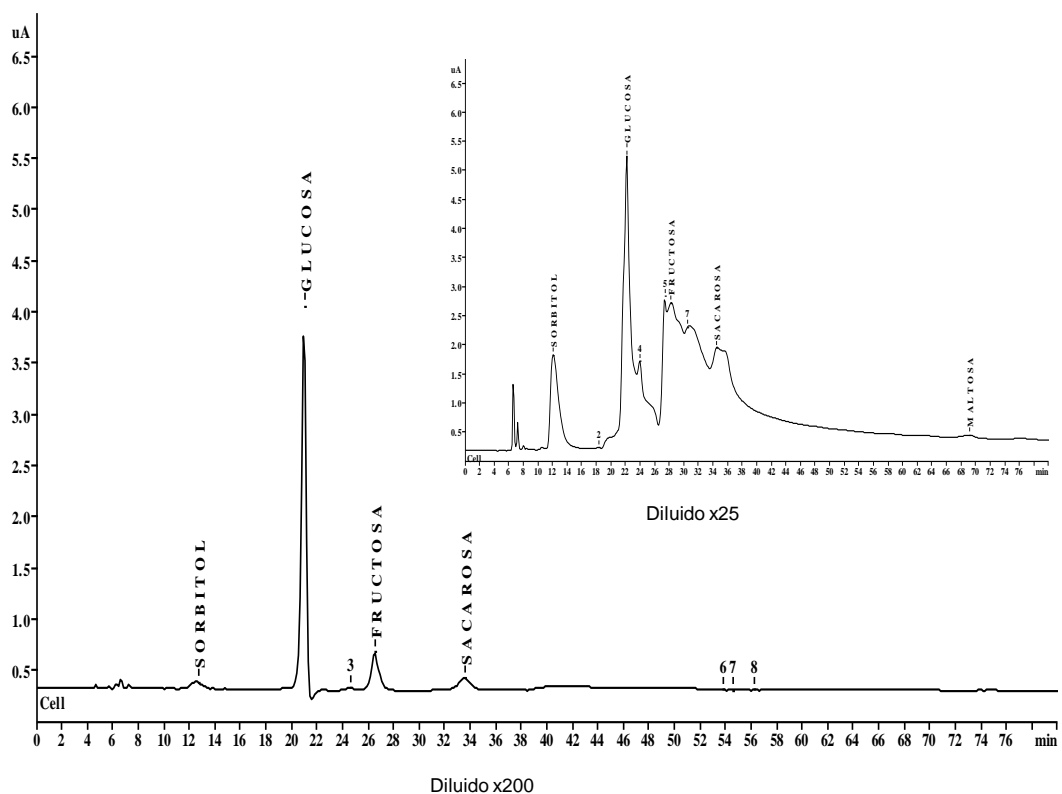


Figura 4.21. Perfil de azúcares de zumo reconstituido de manzana con jarabe de glucosa (Z13).

Análisis del perfil de azúcares en la autenticación de zumos de frutas

Resultados y Discusión

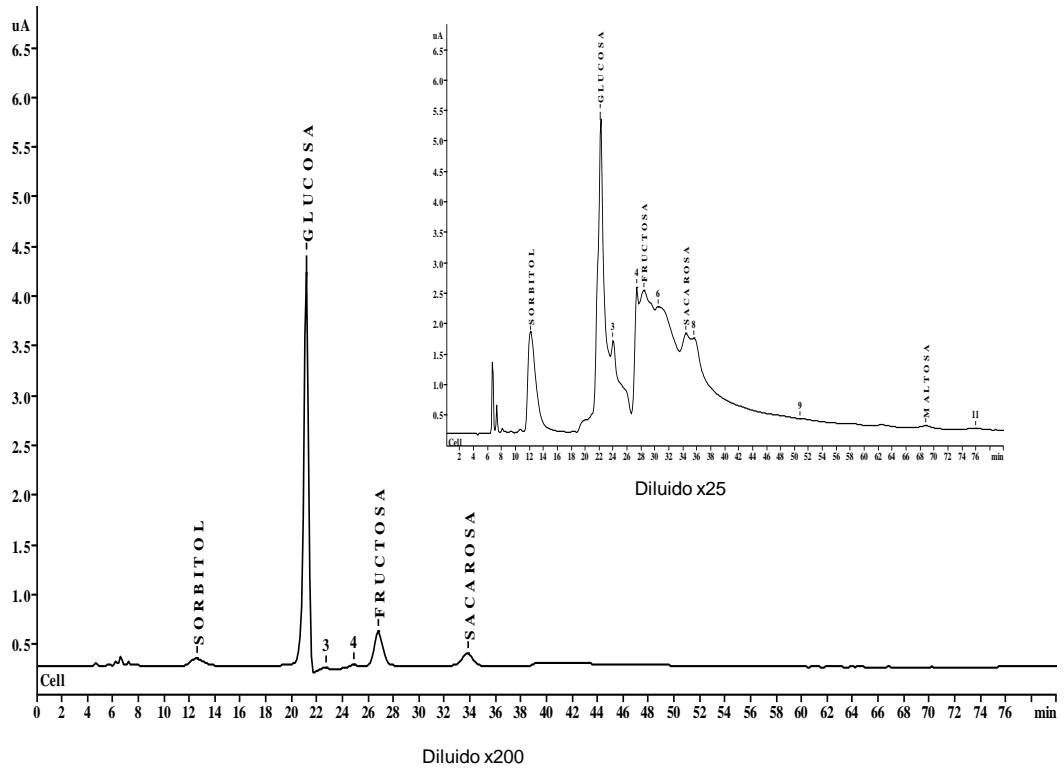


Figura 4.22. Perfil de azúcares de zumo reconstituido de manzana con jarabe de glucosa (Z14).

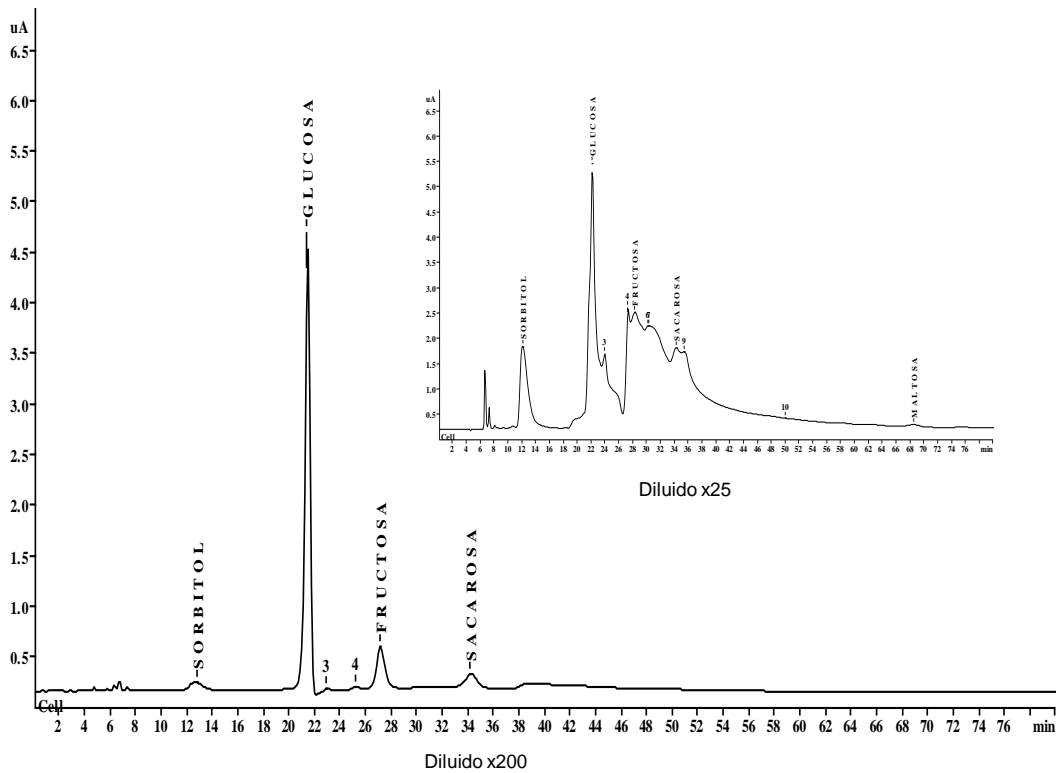


Figura 4.23. Perfil de azúcares de zumo reconstituido de manzana con jarabe de glucosa (Z15).

Análisis del perfil de azúcares en la autenticación de zumos de frutas

Resultados y Discusión

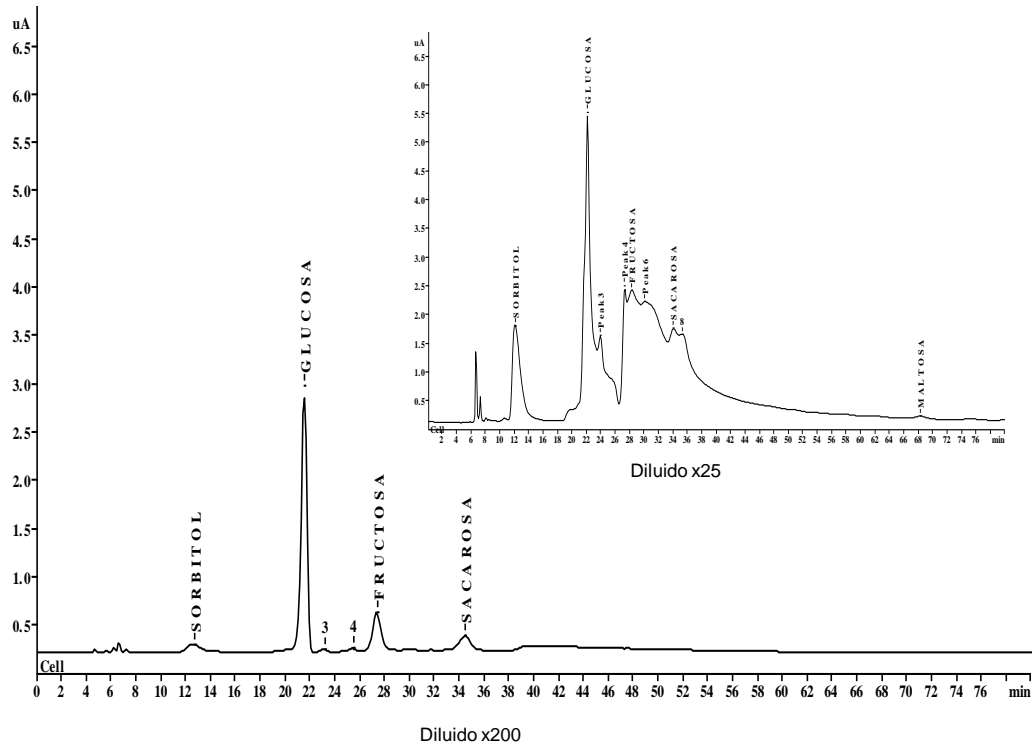


Figura 4.24. Perfil de azúcares de zumo reconstituido de manzana con jarabe de glucosa (Z16).

Si comparamos los perfiles de azúcares a distintas diluciones se observa lo mismo que en los zumos reconstituidos de naranja, que cuando el zumo está más concentrado en la dilución x25 se detectan claramente sorbitol y maltosa. Es decir, a partir de este cromatograma se puede afirmar que se trata de zumos de manzana, por la presencia de sorbitol, y que se le ha añadido jarabe de glucosa por la presencia de maltosa. En la dilución x200 no se detecta maltosa y sí se ve claramente el perfil de azúcares característico de un zumo de manzana. Así como ocurre con la naranja. En los análisis rutinarios la maltosa no se detectaría ya que se realizan con una dilución x1000. Debido a esto se tienen que estudiar los cambios en las relaciones de azúcares para poder detectar azúcares añadidos.

La Tabla 4.6 muestra los resultados de los análisis por HPAEC-PAD de los zumos de manzana reconstituidos diluidos x200. Al igual que en los resultados anteriores se han recogido los datos de tiempos de retención, porcentaje de área correspondiente a cada compuesto en el cromatograma, y se han calculado las relaciones de área entre los distintos azúcares presentes.

Análisis del perfil de azúcares en la autenticación de zumos de frutas

Resultados y Discusión

Tabla 4.6. Tiempos de retención, porcentajes de área y relación de azúcares en zumos de manzana reconstituidos.

Azúcar	Sorbitol	Glucosa	Fructosa	Sacarosa			
tr (min)	12.33	21.73	27.49	34.04			
Zumo					Glc/Fru	Glc/Sac	Fru/Sac
Manzana + Z13 Dil. x200	2,9%	75,415%	12,993%	4,986%	5,804	15,125	2,606
Manzana + Z14 Dil. x200	2,56%	73,494%	13,827%	5,1%	5,315	14,411	2,711
Manzana + Z15 Dil. x200	3,32%	72,436%	13,901%	5,319%	5,211	13,618	2,613
Manzana + Z16 Dil. x200	4,466%	69,21%	15,687%	7,723%	4,412	8,961	2,031

Comparando estos resultados con los del zumo concentrado de manzana de la Tabla 4.3, se observa como varían los porcentajes de áreas y las relaciones de azúcares: La relación Glucosa/Fructosa que es 1,3 en el zumo concentrado (Tabla 4.3) y 0,7 en el natural (Tabla 4.4). Aquí es entre tres y cuatro veces mayor que en el zumo concentrado y entre 6 y 8 veces mayor que en el zumo natural. De la misma manera la relación Glucosa/Sacarosa aumenta en los zumos reconstituidos entre 5 y 8 veces con respecto al zumo concentrado y entre 2 y 3 veces con respecto al zumo natural. La relación Fructosa/Sacarosa aumenta en menor proporción entre 1,8 y 1,4 veces. En conjunto se observa como las relaciones de azúcares aumentan porque se adicionan azúcares ricos en glucosa y fructosa. Los porcentajes de áreas y a las relaciones de azúcares de los cuatro zumos reconstituidos son muy diferentes a las del zumo de manzana concentrado pero el que más se podría parecer al zumo de manzana concentrado sería el zumo de manzana reconstituido con Z16, ya que es el que tiene unos valores de porcentaje de área y relaciones de azúcares más bajos.

Los cromatogramas donde podemos ver el perfil de azúcares obtenido para los zumos de piña reconstituidos y analizados diluidos x200 y x25, se muestran en las Figuras 4.25, 4.26, 4.27 y 4.28. Solo se ha incluido el cromatograma correspondientes a la dilución x25 en el zumo reconstituido con Z13 (Figura 4.25), pero son similares a los obtenidos en los casos anteriores, y evidencian la adición de jarabe de glucosa por detectarse maltosa.

Análisis del perfil de azúcares en la autenticación de zumos de frutas
Resultados y Discusión

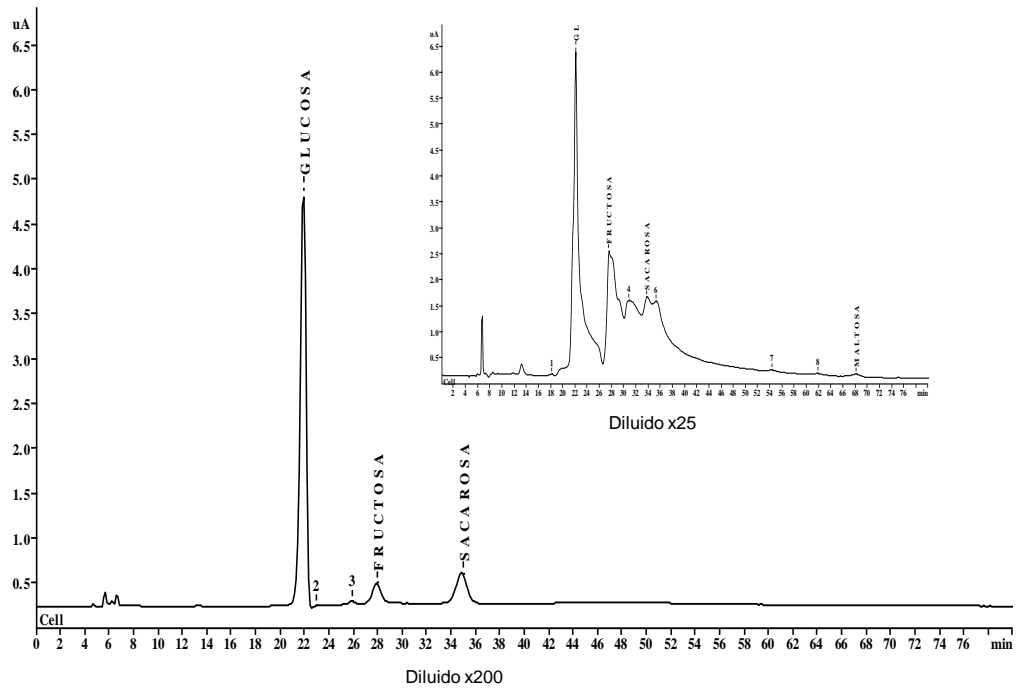


Figura 4.25. Perfil de azúcares de zumo reconstituido de piña con jarabe de glucosa (Z13).

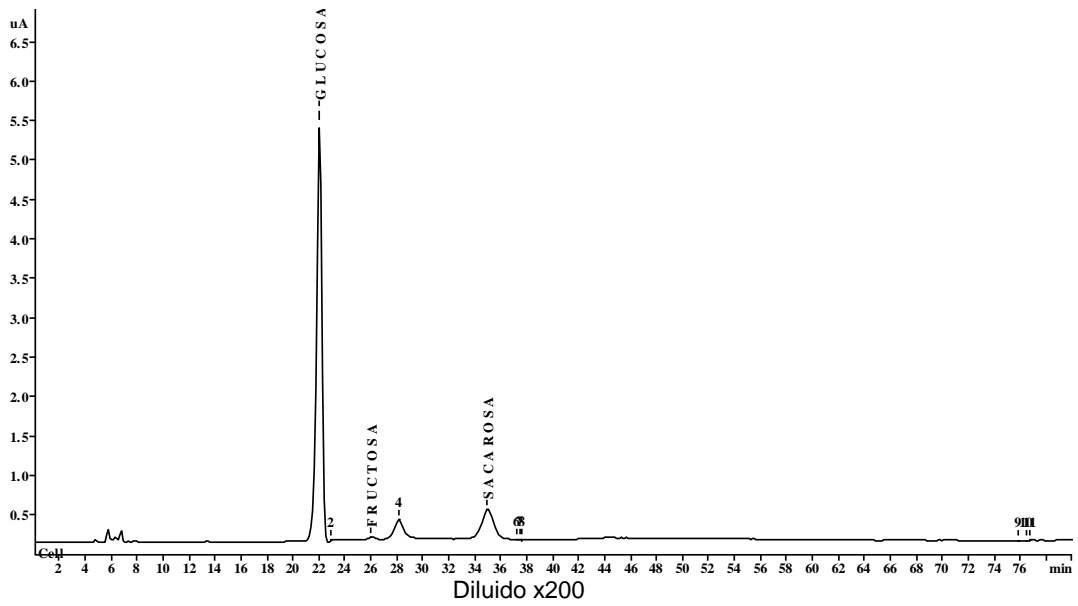


Figura 4.26. Perfil de azúcares de zumo reconstituido de piña con jarabe de glucosa (Z14).

Análisis del perfil de azúcares en la autenticación de zumos de frutas

Resultados y Discusión

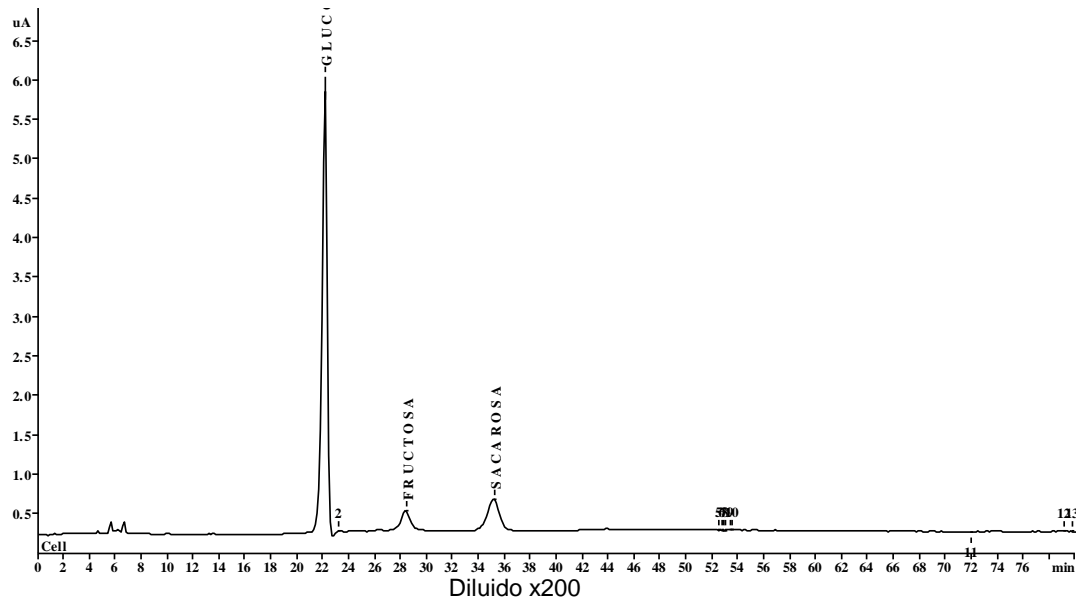


Figura 4.27. Perfil de azúcares de zumo reconstituido de piña con jarabe de glucosa (Z15).

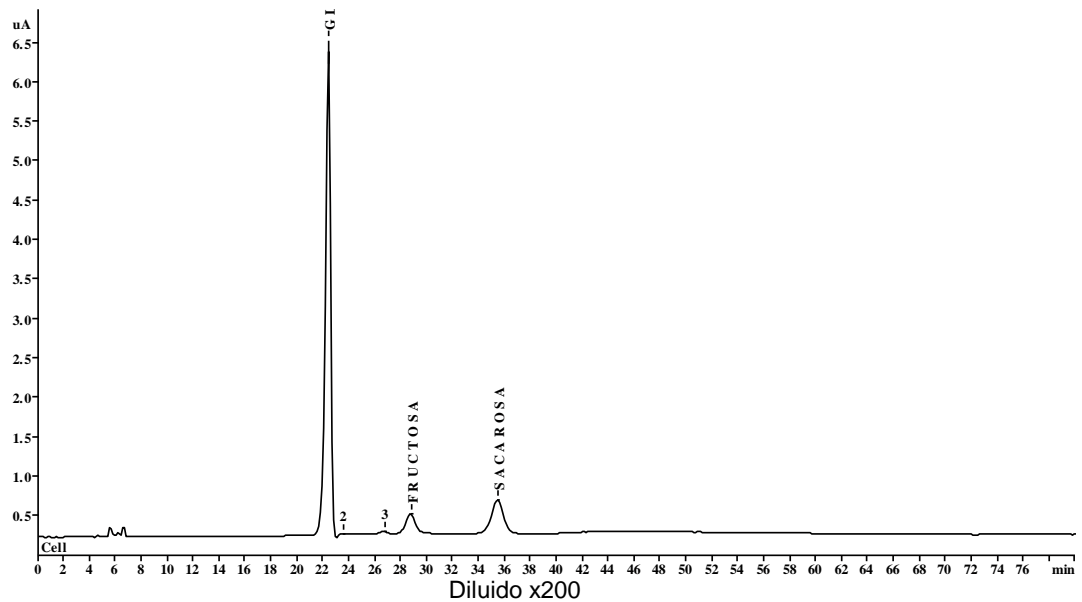


Figura 4.28. Perfil de azúcares de zumo reconstituido de piña con jarabe de glucosa (Z16).

De la misma manera que en los casos anteriores, al diluir el zumo x200 no se observa maltosa. Así, en un análisis rutinario con el zumo diluido x1000 la maltosa no se detecta. Estos cromatogramas muestran el perfil de azúcares característico del zumo de piña en el que muestra glucosa, fructosa y sacarosa. Es necesario recurrir nuevamente a las relaciones de azúcares para poder detectar azúcares añadidos en estos zumos.

Análisis del perfil de azúcares en la autenticación de zumos de frutas

Resultados y Discusión

Observando los perfiles de azúcares de los zumos de naranja reconstituidos y los zumos de manzana podríamos diferenciar uno del otro, ya que los zumos de naranja contienen mioinositol, que es un compuesto propio de la fruta fresca, y los zumos de manzana contienen sorbitol, que también es un compuesto propio de la fruta fresca. Sin embargo, el zumo de piña no contiene un azúcar característico de esta fruta ni otro compuesto característico que se detecte con este método, por lo que para su autenticación habría que recurrir a otros análisis para detectar otros compuestos propios de esta fruta.

La Tabla 4.7 muestra los resultados de los análisis por HPAEC-PAD de los zumos de piña reconstituidos diluidos x200. Al igual que en los resultados anteriores se han recogido los datos de porcentaje de tiempo de retención, área correspondiente a cada compuesto en el cromatograma, y se han calculado las relaciones de área entre los distintos azúcares presentes.

Tabla 4.7. Tiempos de retención, porcentajes de área y relación de azúcares en zumos de piña reconstituidos.

Azúcar	Glucosa	Fructosa	Sacarosa			
tr (min)	21.73	27.49	34.04			
Zumo				Glc/Fru	Glc/Sac	Fru/Sac
Piña + Z13 Dil. x200	80,749%	6,228%	12,07%	12,965	6,69	0,516
Piña + Z14 Dil. x200	77,956%	6,744%	13,017%	11,559	5,989	0,518
Piña + Z15 Dil. x200	76,833%	7,235%	13,289%	10,62	5,782	0,544
Piña + Z16 Dil. x200	78,666%	6,067%	13,297%	12,966	5,916	0,456

Comparando los resultados del zumo concentrado de piña de la Tabla 4.3 con los zumos reconstituidos de la Tabla 4.6, se observa como varían los porcentajes de áreas y las relaciones de azúcares: Glucosa/Fructosa y Glucosa/Sacarosa, menos la relación Fructosa/Sacarosa que no varía casi nada. La relación glucosa/fructosa aumenta del orden de 4 veces con respecto al concentrado, y unas 7 veces con respecto al zumo natural. La relación glucosa/sacarosa es 4 y 10 veces mayor que en el zumo concentrado y natural respectivamente. No hay ningún zumo reconstituido que parezca más que otro al zumo de piña concentrado. En general las relaciones de azúcares Glucosa/Fructosa y Glucosa/Sacarosa aumentan en el zumo reconstituido

Análisis del perfil de azúcares en la autenticación de zumos de frutas

Resultados y Discusión

como consecuencia de la adición de jarabe de glucosa rico en estos monosacáridos.

En conjunto de los análisis de zumos reconstituidos con jarabe de glucosa, podemos concluir que la maltosa pasaría desapercibida en un análisis rutinario pero la relación de azúcares varía de manera muy importante, y puede utilizarse como criterio para evidenciar la presencia de azúcares añadidos en un zumo reconstituido a partir de zumo concentrado.

4.6. Análisis del perfil de azúcares en zumos comerciales.

Para comprobar la validez y utilidad de nuestro estudio se analizaron distintos zumos comerciales de naranja, manzana y piña adquiridos en distintos supermercados de los que se obtuvo su perfil de azúcares por HPAEC-PAD.

Así se analizaron 10 zumos de naranja de tres orígenes distintos según la casa comercial 1) 100% zumo refrigerado, 2) 100% zumo no refrigerado y 3) 100% zumo no refrigerado procedente de concentrado.

Los zumos no refrigerados deben ser pasteurizados para que se conserven a temperatura ambiente, este proceso no afecta al contenido en azúcares.

A continuación, las Figuras 4.29 a la 4.38 muestran los cromatogramas de los zumos comerciales de naranja analizados. De la observación de los 10 cromatogramas se deduce que mediante el perfil de azúcares no se puede determinar el origen ó tipo de procesamiento ya que todos los cromatogramas son más o menos iguales. Muestran el perfil característico de un zumo de naranja, con mioinositol, glucosa, fructosa y sacarosa. Los zumos tienen una mayor concentración de glucosa ya que el pico es el más alto, luego le sigue la sacarosa y por último la fructosa.

Análisis del perfil de azúcares en la autenticación de zumos de frutas

Resultados y Discusión

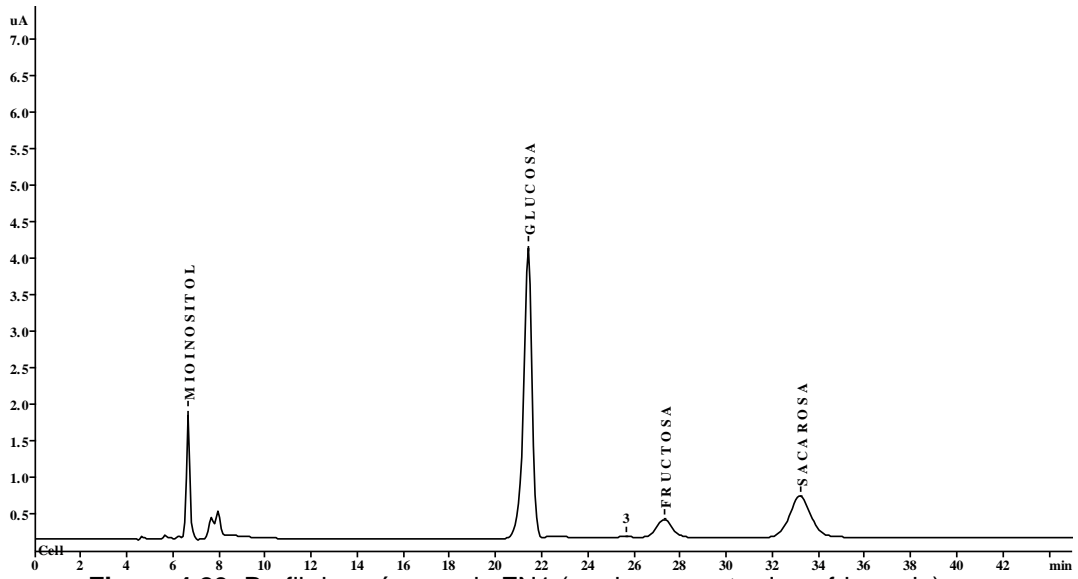


Figura 4.29. Perfil de azúcares de ZN1 (no de concentrado, refrigerado).

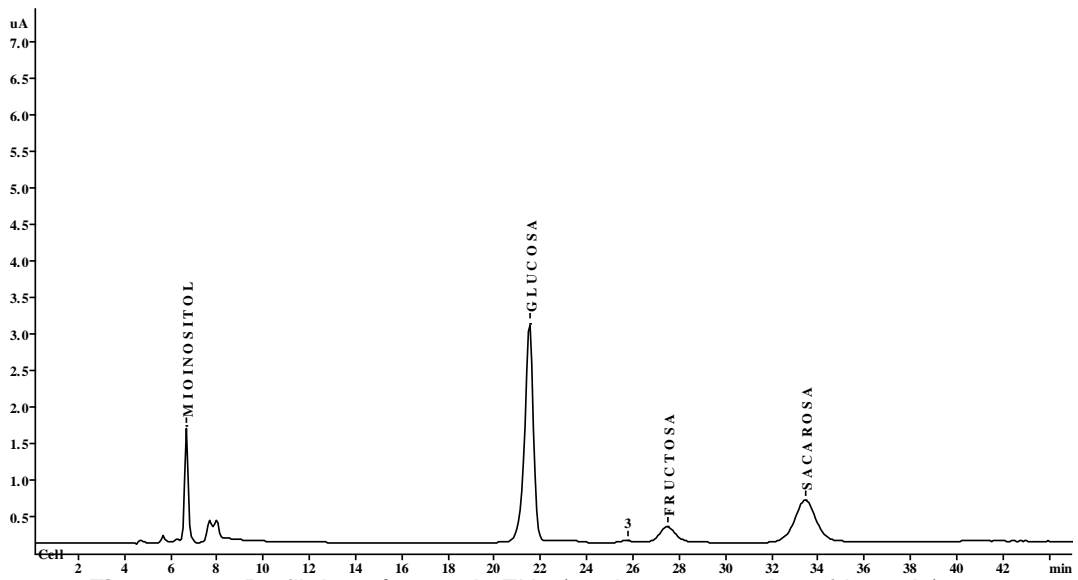


Figura 4.30. Perfil de azúcares de ZN2 (no de concentrado, refrigerado).

Análisis del perfil de azúcares en la autenticación de zumos de frutas
Resultados y Discusión

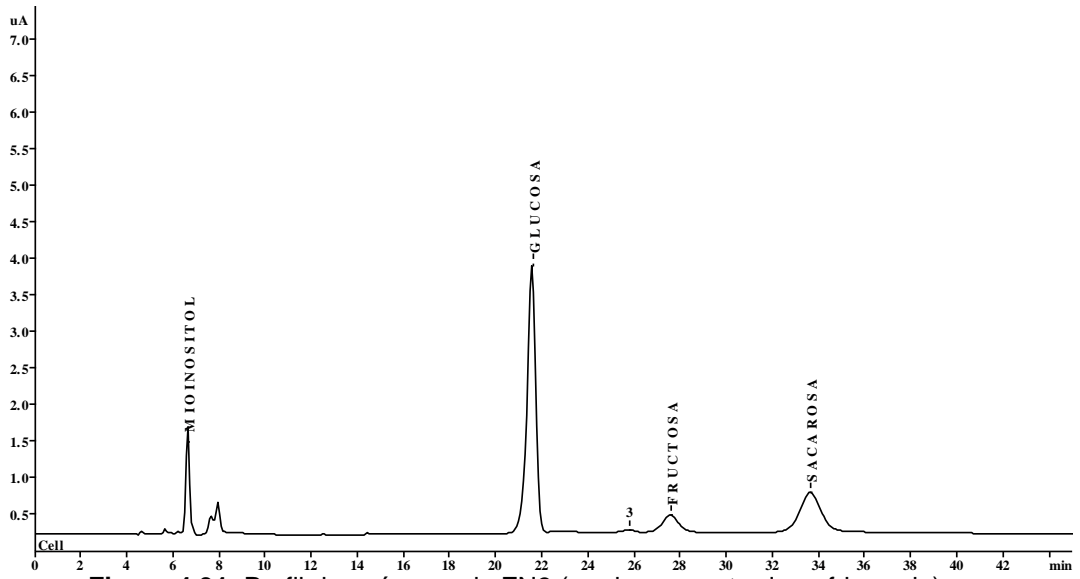


Figura 4.31. Perfil de azúcares de ZN3 (no de concentrado, refrigerado).

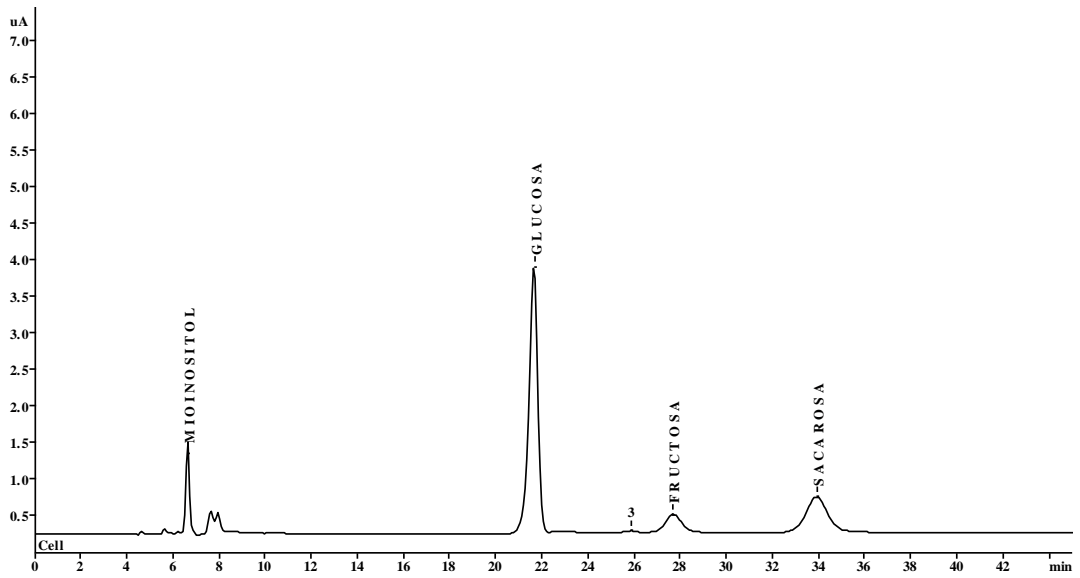


Figura 4.32. Perfil de azúcares de ZN4 (de concentrado, no refrigerado).

Análisis del perfil de azúcares en la autenticación de zumos de frutas
Resultados y Discusión

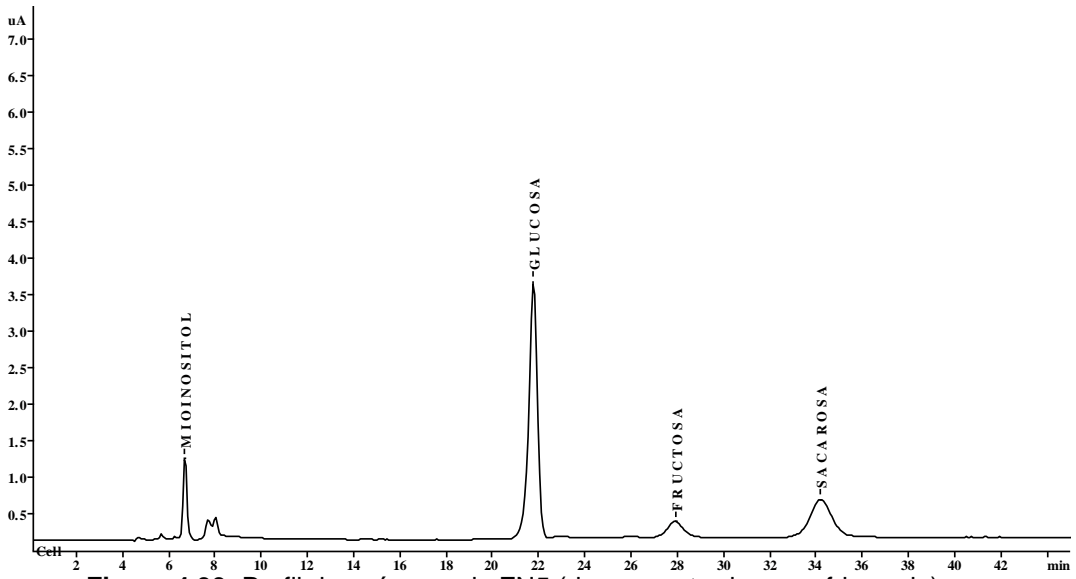


Figura 4.33. Perfil de azúcares de ZN5 (de concentrado, no refrigerado).

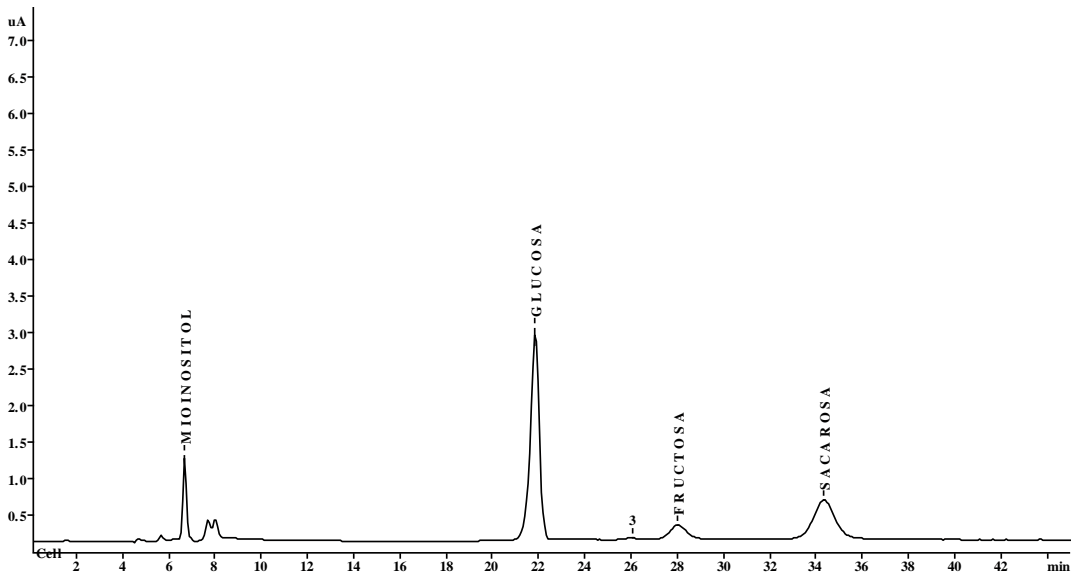


Figura 4.34. Perfil de azúcares de ZN6 (de concentrado, no refrigerado).

Análisis del perfil de azúcares en la autenticación de zumos de frutas

Resultados y Discusión

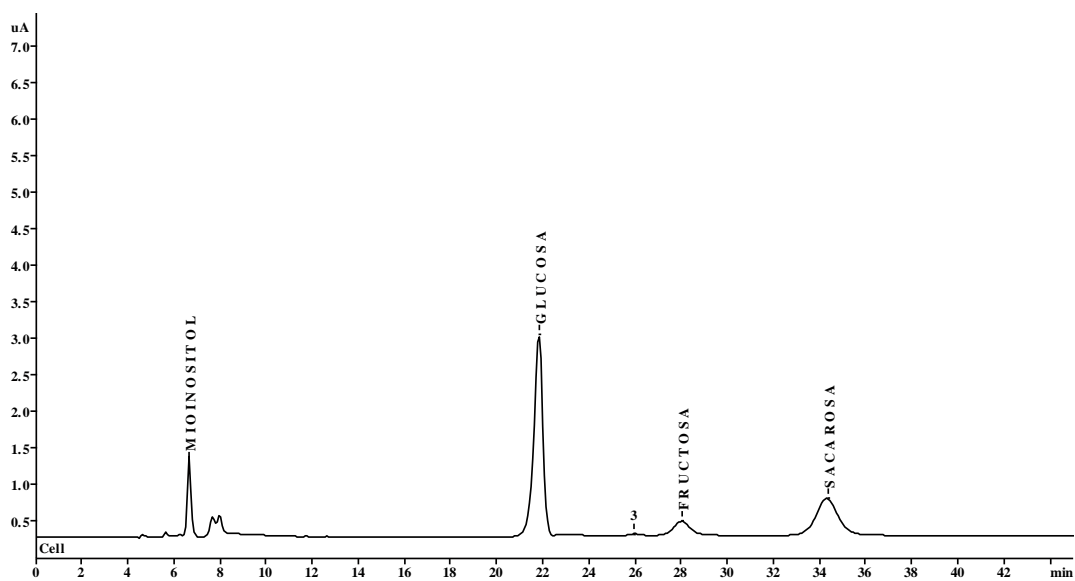


Figura 4.35. Perfil de azúcares de ZN7 (de concentrado, no refrigerado).

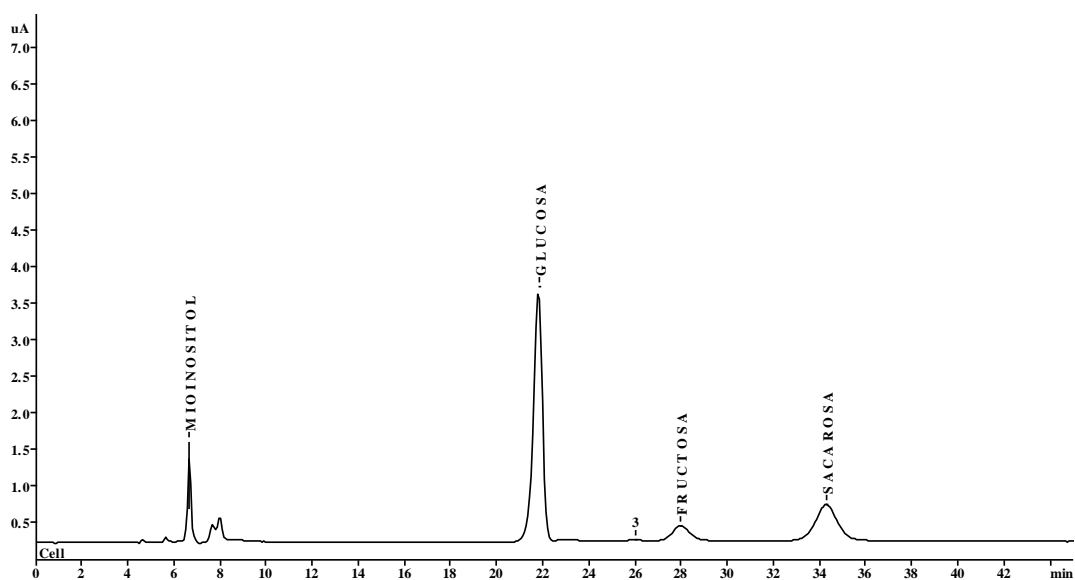


Figura 4.36. Perfil de azúcares de ZN8 (no de concentrado, no refrigerado).

Análisis del perfil de azúcares en la autenticación de zumos de frutas

Resultados y Discusión

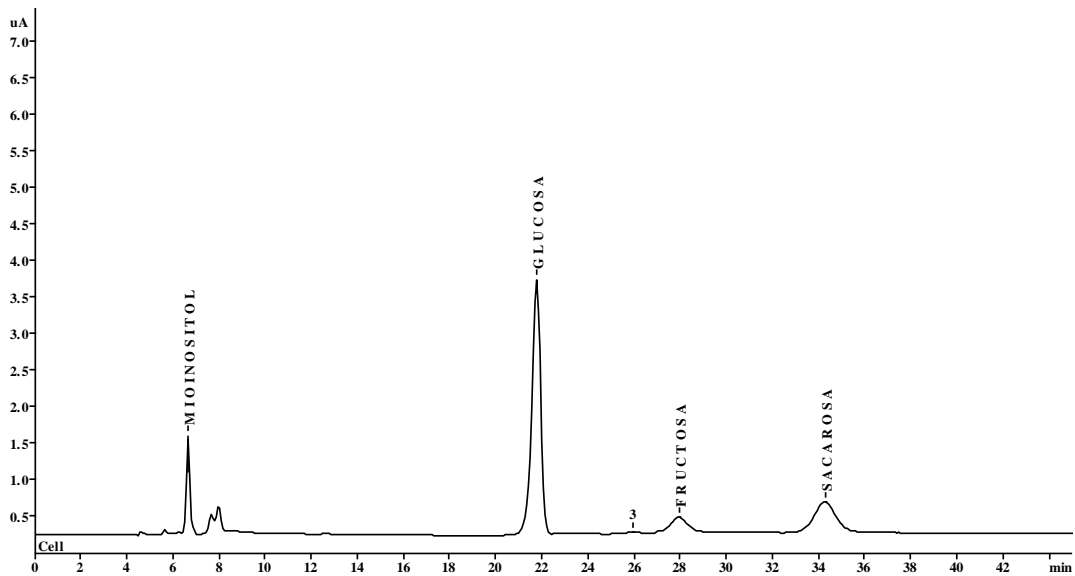


Figura 4.37. Perfil de azúcares de ZN9 (no de concentrado, no refrigerado).

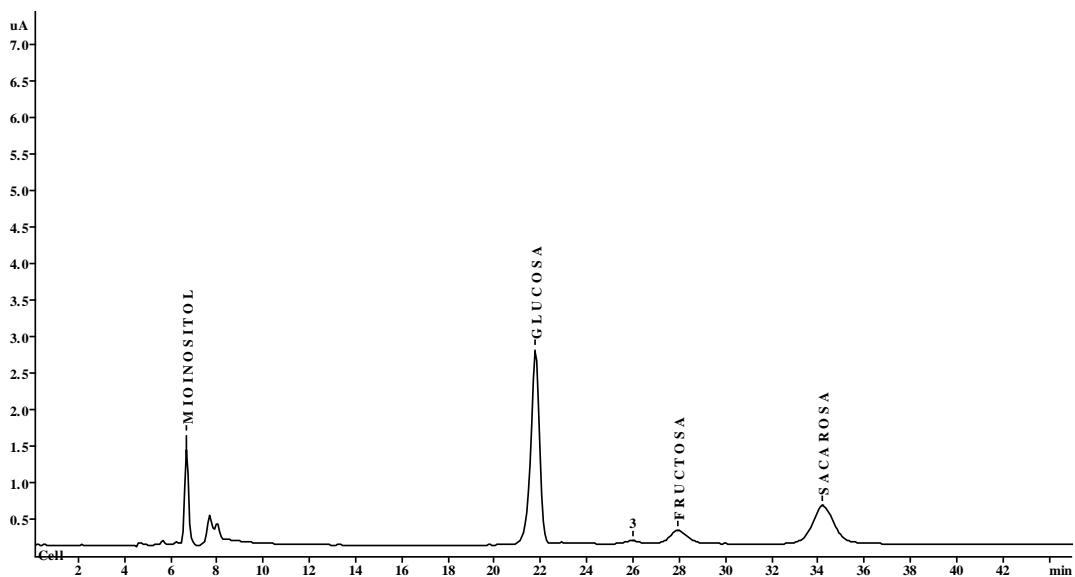


Figura 4.38. Perfil de azúcares de ZN10 (no de concentrado, no refrigerado).

Los resultados de los análisis se muestran en la Tabla 4.8. Las relaciones de azúcares son más o menos uniformes en todos los zumos de naranja comerciales, difieren de los encontrados en el zumo concentrado y en el zumo natural. Comparando estas relaciones de azúcares con las del zumo de naranja concentrado (Tabla 4.3) y natural (Tabla 4.4) podemos observar una gran variación en la relación glucosa/fructosa, una pequeña variación en la relación glucosa/sacarosa y ninguna variación en la relación fructosa/sacarosa. El valor medio de la relación Glucosa/Fructosa de los 10 zumos estudiados es 7,4, esto es 3,2 veces superior al determinado en el zumo de naranja concentrado y 3,5 veces superior al del zumo natural de naranja. Estas diferencias tan grandes hacen pensar que el aumento de la relación

Análisis del perfil de azúcares en la autenticación de zumos de frutas

Resultados y Discusión

Glucosa/Fructosa podría ser consecuencia de la adición de azúcares. Asumiendo esta suposición, se trataría de una práctica generalizada entre los fabricantes de zumos ya que los zumos comerciales se han seleccionado al azar y hay una alta coincidencia entre ellos. Si bien hay que tener en cuenta que no se han analizado varios zumos de naranja concentrados, de distintos proveedores, como para sacar unas conclusiones más definitivas.

Con respecto al porcentaje de área del mioinositol, glucosa, fructosa y sacarosa más o menos en todos los zumos es igual, no hay una gran diferencia en ninguno de ellos.

Tabla 4.8. Tiempo de retención, porcentajes de área y relación de azúcares en zumos de naranja comerciales.

Azúcar	Clase	Mioinositol	Glucosa	Fructosa	Sacarosa			
tr (min)		6.5	21.73	27.49	34.04			
Zumo						Glc/Fru	Glc/Sac	Fru/Sac
ZN1	No de concentrado, refrigerado	14,064%	65,755%	8,91%	23,965%	7,38	2,744	0,372
ZN2		17,949%	60,785%	8,323%	30,034%	7,303	2,76	0,277
ZN3		10,768%	64,231%	9,028%	23,268%	7,115	2,76	0,388
ZN4	De concentrado, no refrigerado	9,735%	66,915%	9,601%	22,389%	6,97	2,989	0,429
ZN5		9,629%	66,506%	7,852%	25,642%	8,47	2,594	0,306
ZN6		12,359%	61,796%	8,392%	28,806%	7,364	2,145	0,291
ZN7		12,455%	62,276%	9,06%	27,55%	6,874	2,26	0,329
ZN8	No de concentrado, no refrigerado	12,143%	67,253%	7,565%	24,529%	8,89	2,742	0,308
ZN9		12,614%	67,145%	10,137%	21,835%	6,624	3,075	0,464
ZN10		18,854%	60,481%	8,795%	28,784%	6,877	2,101	0,305

También se analizaron 5 zumos comerciales de manzana de distinto origen: zumo procedente de concentrado no refrigerado y no procedente de concentrado refrigerado.

Las Figuras 4.39 a la 4.43 muestran los cromatogramas de los zumos comerciales de manzana analizados diluidos x200. El perfil de azúcares es similar para todos ellos, se aprecia el sorbitol en todos, glucosa como azúcar mayoritario, seguido de fructosa y sacarosa. Así por el perfil de azúcares no

Análisis del perfil de azúcares en la autenticación de zumos de frutas

Resultados y Discusión

podemos distinguir entre un zumo refrigerado no proveniente de concentrado o un zumo proveniente de concentrado no refrigerado, ya que todos los cromatogramas son más o menos iguales. Podemos ver una diferencia con el zumo de naranja ya que ésta tiene más sacarosa que fructosa. Además se puede observar al inicio del cromatograma el sorbitol que demuestra que se trata de zumos de manzana.

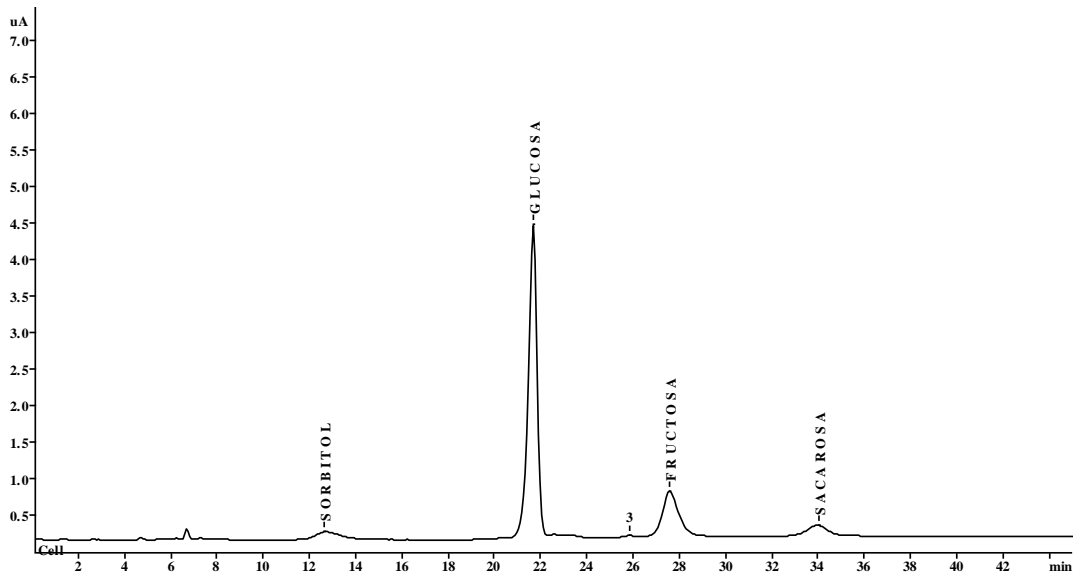


Figura 4.39. Perfil de azúcares de ZM1 (de concentrado).

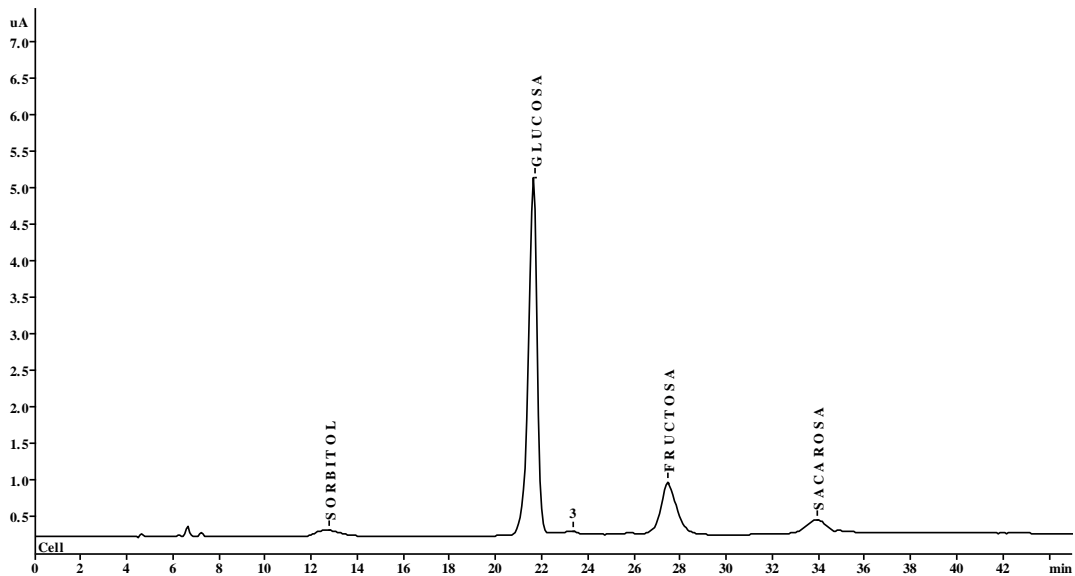


Figura 4.40. Perfil de azúcares de ZM2 (de concentrado).

Análisis del perfil de azúcares en la autenticación de zumos de frutas
Resultados y Discusión

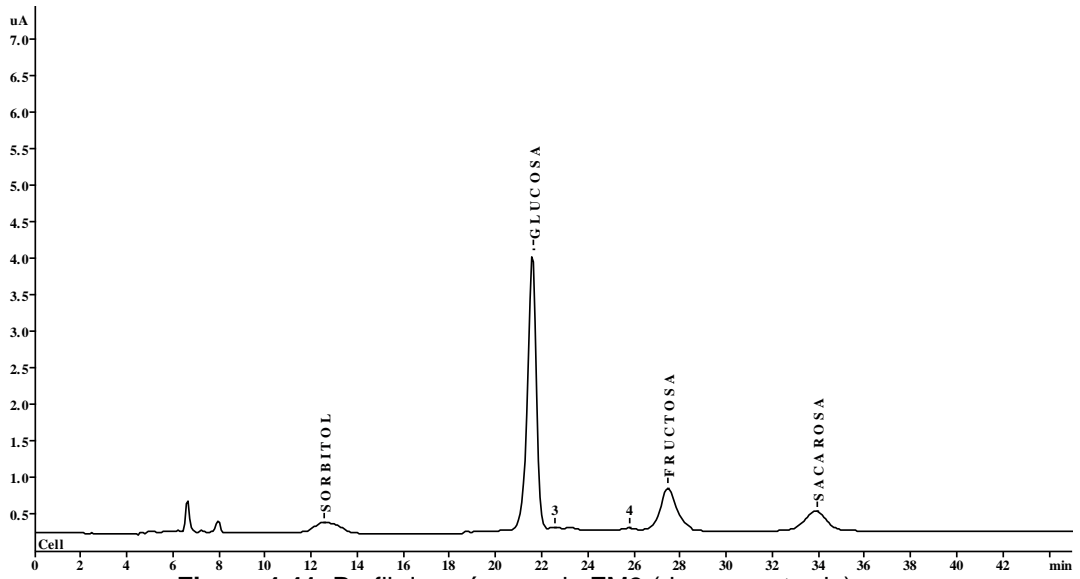


Figura 4.41. Perfil de azúcares de ZM3 (de concentrado).

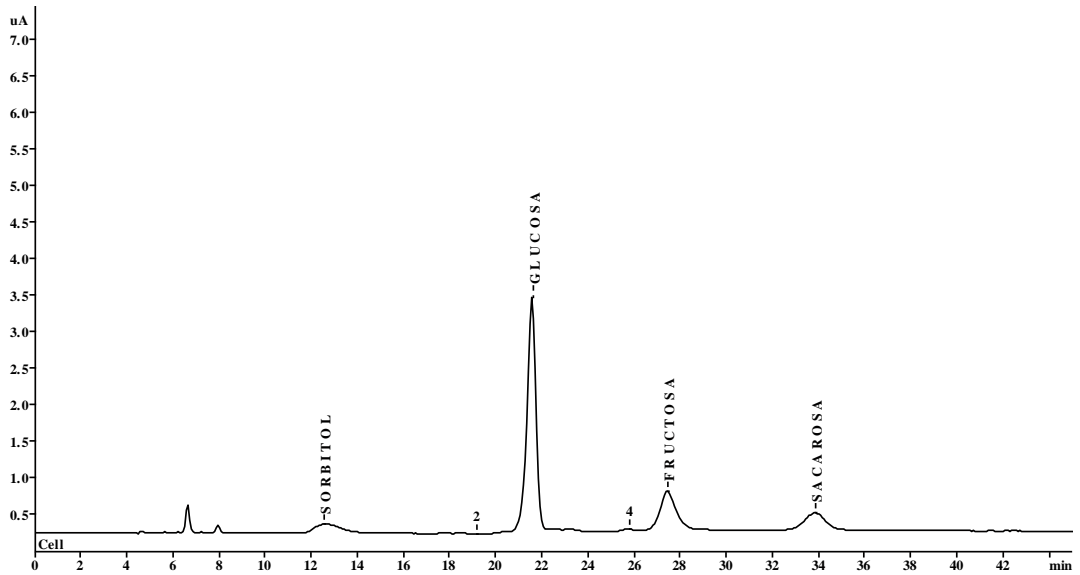


Figura 4.42. Perfil de azúcares de ZM4 (de concentrado).

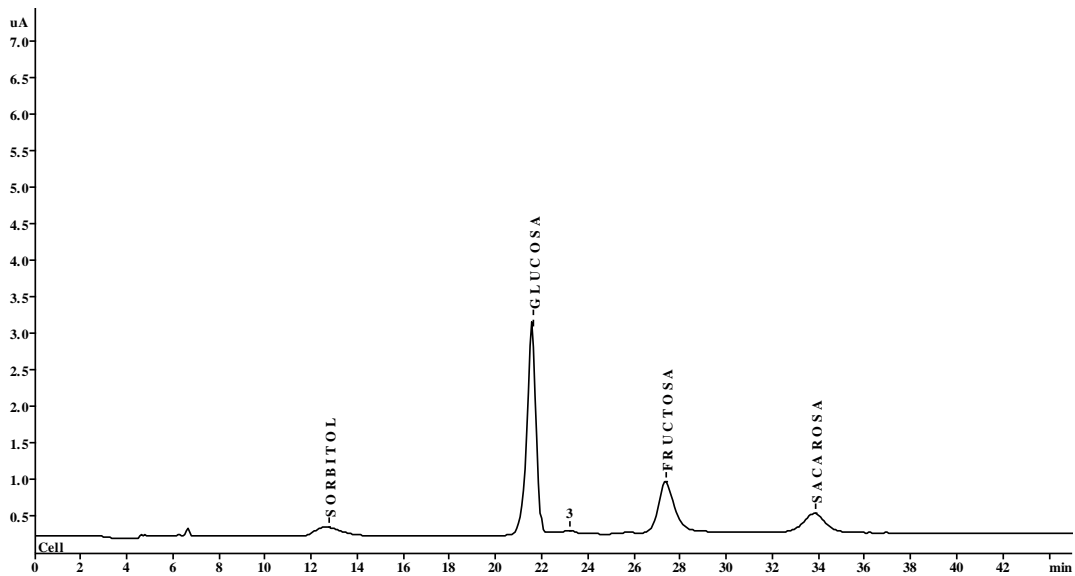


Figura 4.43. Perfil de azúcares de ZM5 (no de concentrado, refrigerado).

Los resultados de los análisis se muestran en la Tabla 4.9. Comparando las relaciones de azúcares de ésta Tabla con los de las Tablas 4.3 (zumo de manzana concentrado) y 4.4 (zumo de manzana natural), podemos observar un leve aumento en la relación glucosa/fructosa y fructosa/sacarosa de los zumos comerciales respecto al concentrado. Donde se observa un mayor aumento es en la relación glucosa/sacarosa y sobre todo en los zumos ZM1 y ZM2 proveniente de concentrado y no refrigerados. Nos encontramos con una situación similar a la del zumo de naranja, pero en este caso las diferencias son menores, la relación Glucosa/Fructosa media de los zumos comerciales es de 3,28, este valor es 2,5 veces superior al del zumo concentrado y 4,6 veces superior al del zumo natural. Por lo que se podría decir que debido a éste cambio en la relación glucosa/sacarosa los zumos puede que tenga algún tipo de adición de azúcar. Esta observación también podría atribuirse a la variedad de manzana utilizada en la elaboración de los zumos. Ya que se trata de una fruta con un número muy elevado de variedades que pueden tener contenidos en azúcares muy diferentes entre una variedad y otra.

Si comparamos el porcentaje de glucosa de los zumos a base de concentrado y no refrigerados con el de no de concentrado y refrigerado vemos que el porcentaje de glucosa de éste último es menor que el de los zumos a base de concentrado y no refrigerados. Ocurre al revés en el caso del porcentaje de fructosa y sacarosa, ya que es mayor en el zumo que no

Análisis del perfil de azúcares en la autenticación de zumos de frutas

Resultados y Discusión

proviene de concentrado y es refrigerado con respecto al los zumo a base de concentrado y no refrigerados.

Tabla 4.9. Tiempo de retención, porcentajes de área y relación de azúcares en zumos de manzana comerciales.

Azúcar	Clase	Sorbitol	Glucosa	Fructosa	Sacarosa			
tr (min)		12.21	21.73	27.49	34.04			
Zumo						Glc/Fru	Glc/Sac	Fru/Sac
ZM1	De concentrado, no refrigerado	4,853%	69,938%	18,819%	5,841%	3,716	11,974	3,222
ZM2		3,78%	66,926%	18,472%	6,449%	3,623	10,378	2,864
ZM3		6,809%	61,463%	17,894%	10,997%	3,435	5,589	1,627
ZM4		6,783%	62,764%	18,285%	10,684%	3,432	5,874	1,711
ZM5	No de concentrado, refrigerado	6,952%	54,746%	23,65%	11,972%	2,315	4,573	1,975

Además de los zumos de naranja y manzana, se analizaron cinco zumos de piña comerciales de distinto origen: zumo procedente de concentrado no refrigerado, no procedente de concentrado refrigerado y no procedente de concentrado no refrigerado.

Las Figura 4.44 a la 4.48, se muestran los cromatogramas de los zumos comerciales de piña analizados. Los perfiles de azúcares obtenidos no permiten distinguir el origen del zumo, ya que todos los cromatogramas son más o menos iguales. Estos muestran una mayor concentración de glucosa ya que el pico es el más alto (igual que ocurre en la naranja y la manzana), luego le sigue la sacarosa y por último la fructosa, al igual que ocurre en la naranja y al contrario de la manzana que tiene más fructosa que sacarosa. El zumo de piña se diferencia del de naranja y manzana porque no contiene mioinositol ni sorbitol presentes en estas frutas, respectivamente. Sin embargo, el perfil de azúcares, como ya se ha indicado anteriormente no permitirá diferenciar de otros zumos que solo contengan glucosa, fructosa y sacarosa, para su autenticación habría que recurrir a otros análisis.

Análisis del perfil de azúcares en la autenticación de zumos de frutas
Resultados y Discusión

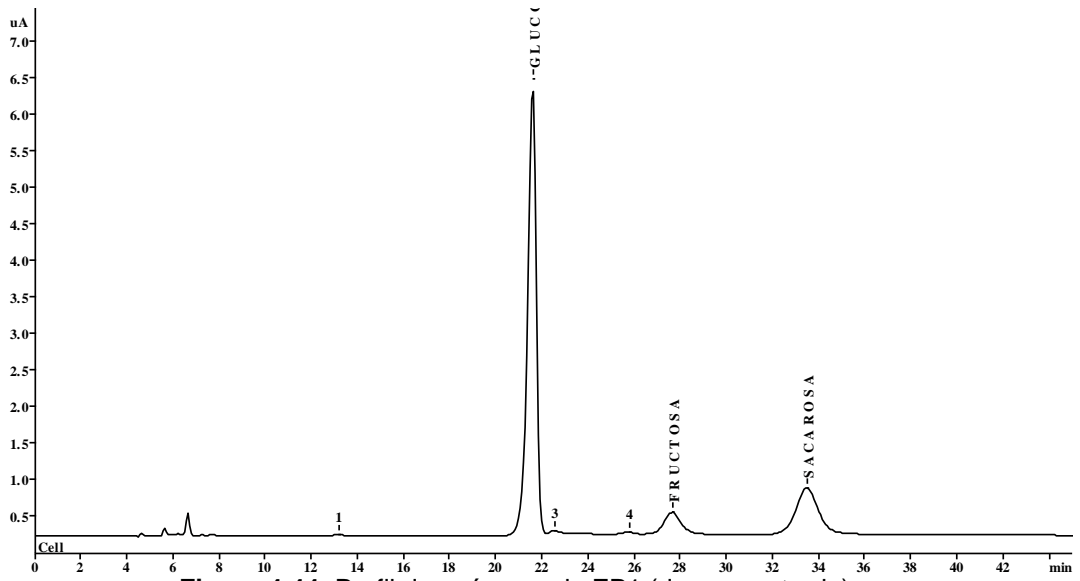


Figura 4.44. Perfil de azúcares de ZP1 (de concentrado).

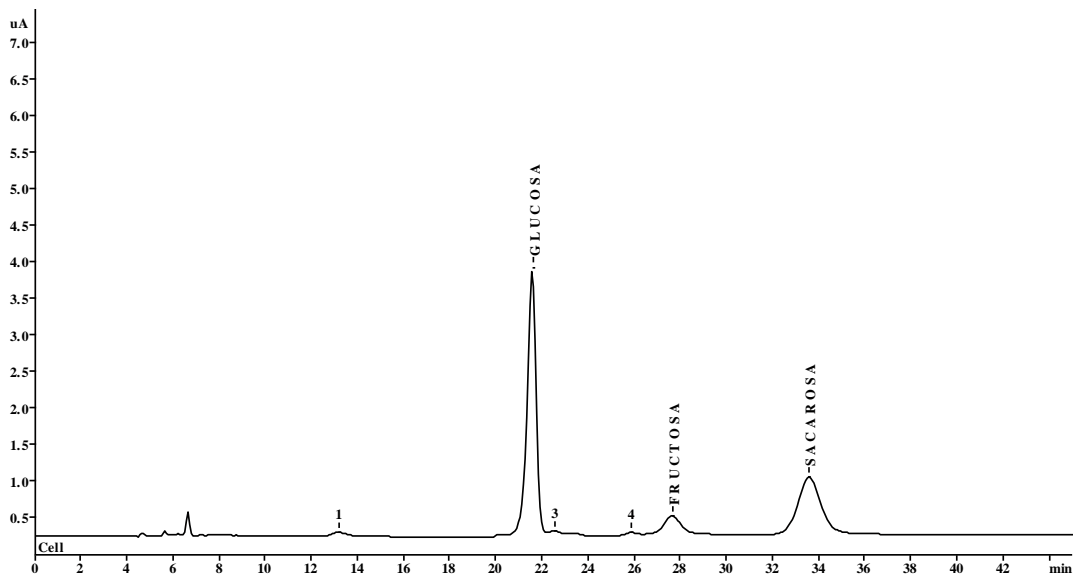


Figura 4.45. Perfil de azúcares de ZP2 (de concentrado).

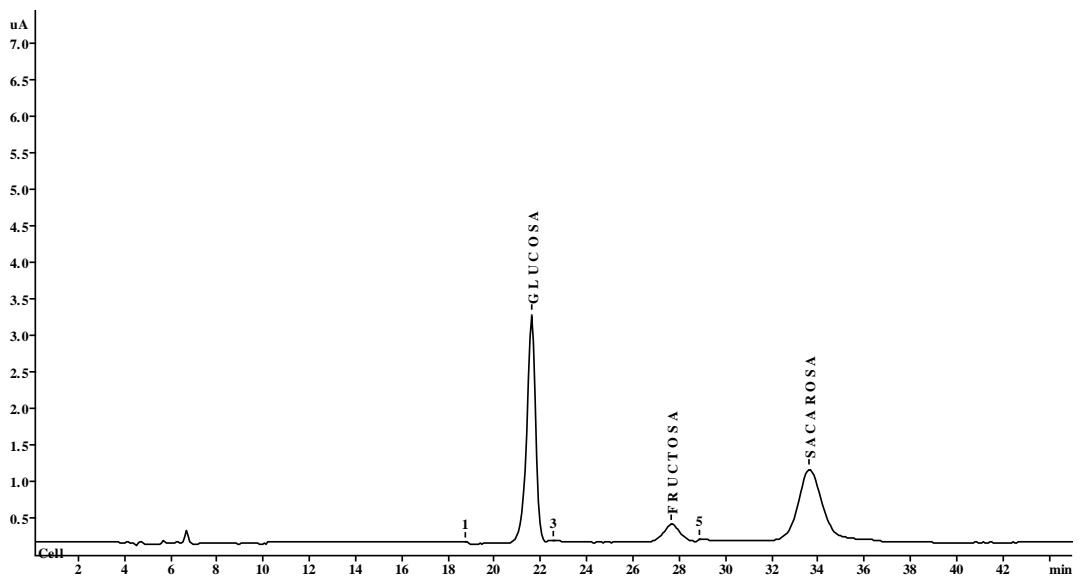


Figura 4.46. Perfil de azúcares de ZP3 (no de concentrado, refrigerado).

Análisis del perfil de azúcares en la autenticación de zumos de frutas

Resultados y Discusión

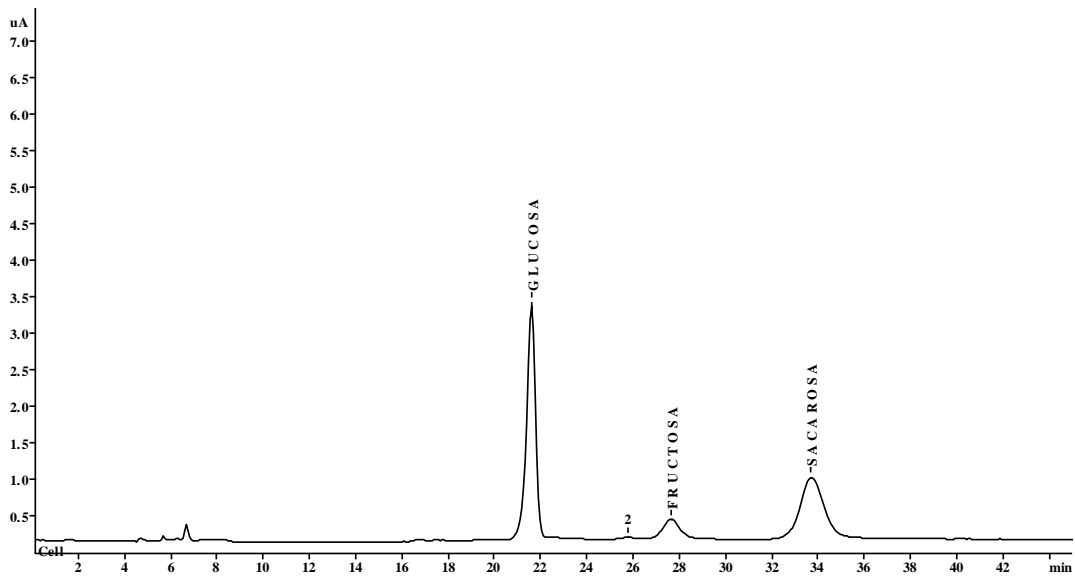


Figura 4.47. Perfil de azúcares de ZP4 (no de concentrado, refrigerado).

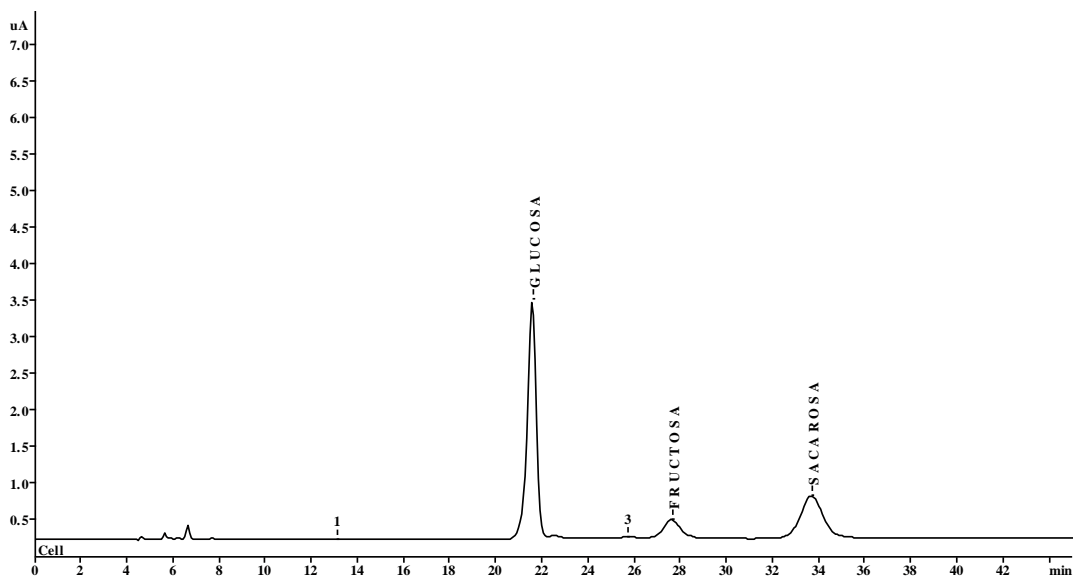


Figura 4.48. Perfil de azúcares de ZP5 (no de concentrado).

En estos perfiles de azúcares no se puede observar si a un zumo se le han añadido algún tipo de azúcar ya que con las muestras diluidas x200 no se detecta maltosa. Los análisis rutinarios se realizan a una dilución x1000 y tampoco se detectaría. Sigue siendo la relación de azúcares la que nos permite detectar los azúcares añadidos.

Los resultados de los análisis se muestran en la Tabla 4.10. Comparando las relaciones de azúcares de ésta Tabla con los de las Tablas 4.3 y 4.4 (zumo de piña concentrado y natural, respectivamente), podemos observar un aumento importante en la relación glucosa/fructosa que es entre 1,7 y 3,2 veces mayor que en el zumo concentrado; y entre 5,5 y 3 veces superior a los

Análisis del perfil de azúcares en la autenticación de zumos de frutas

Resultados y Discusión

valores obtenidos para el zumo de piña natural. Las relaciones Glucosa/Sacarosa también son en general mayores en los zumos comerciales, mientras que la relación Fructosa/Sacarosa varía menos pero es menor que en el zumo de piña concentrado y natural. Como ocurre con la naranja y la manzana, también en el caso de la piña aparece más glucosa en los zumos comerciales.

Tabla 4.10. Porcentajes de área y relación de azúcares en zumos de piña comerciales.

Azúcar	Clase	Glucosa	Fructosa	Sacarosa			
tr (min)		21.73	27.49	34.04			
Zumo					Glc/Fru	Glc/Sac	Fru/Sac
ZP1	De concentrado, no refrigerado	69,882%	7,672%	19,323%	9,109	3,616	0,397
ZP2		53,576%	10,45%	31,047%	5,127	1,726	0,337
ZP3	Refrigerado, no de concentrado	64,429%	6,871%	43,477%	9,377	1,482	0,158
ZP4		51,728%	8,895%	36,898%	6,495	2,225	0,343
ZP5	No de concentrado, no refrigerado	61,693%	9,498%	27,722%	5,815	1,402	0,241

4.7. Análisis y caracterización de los zumos comerciales.

Para complementar el estudio de los zumos comerciales se realizaron diferentes análisis de propiedades físicas, químicas y sensoriales. Así se determinó la densidad, la viscosidad, la acidez valorable, el pH y el valor de °Brix. También se realizó un análisis sensorial de los 20 zumos comerciales analizados por HPAEC-PAD. La densidad se midió con un picnómetro, la viscosidad con un viscosímetro "Canon Flestker", el pH con un pHmetro y los °Brix con un refractómetro tal y como se indica en materiales y métodos. El análisis sensorial se realizó con 20 personas a las que se les dio a probar los zumos comerciales ya descritos en las tablas del apartado 4.6: 10 zumos de naranja, 5 zumos de manzana y 5 de piña. Las características valoradas por los asistentes a la cata fueron el grado de acidez/dulzor, grado de amargor, apariencia y por último grado de satisfacción final.

Análisis del perfil de azúcares en la autenticación de zumos de frutas

Resultados y Discusión

A la vez que se realizó el análisis sensorial se determinaron los parámetros físicos y químicos descritos en la siguiente Tabla. También se recogen los resultados del análisis sensorial de cada zumo analizado.

- **Zumos comerciales de naranja:**

En la siguiente Tabla 4.11 podemos observar los valores de los parámetros físico-químicos determinados.

Tabla 4.11. Valores de los parámetros físico-químicos determinados en zumos comerciales de naranja.

Zumos de naranja	Clase	pH	°Brix	Densidad (Kg/L)	Viscosidad (cps)	Acidez valorable (meq/L)
ZN1	No de concentrado, refrigerado	3,46	12,1	1,048	2,934	148
ZN2		3,56	11,2	1,04	2,761	127
ZN3		3,58	11,2	1,037	3,581	123
ZN4	De concentrado, no refrigerado	3,74	11,4	1,04	2,553	133
ZN5		3,71	11,6	1,042	2,375	115
ZN6		3,77	11,5	1,041	2,557	118
ZN7		3,84	11,3	1,04	2,405	113
ZN8	No de concentrado, no refrigerado	3,65	11,8	1,043	1,709	133
ZN9		3,67	11,4	1,041	2,442	125
ZN10		3,96	11,4	1,041	2,672	106

Observando la tabla podemos decir que no hay una diferencia muy significativa según las diferentes clases de zumos de naranja en función a los distintos parámetros analizados. Podemos decir que tienen un menor pH los zumos que no provienen de concentrado y son refrigerados, y tienen un mayor pH aquellos que provienen de concentrado y no son refrigerados. Respecto a los °Brix todos están entre 11 y 12, y todos tienen una densidad aproximadamente de 1,04Kg/L. Los valores de viscosidad son más altos para los zumos que no proceden de concentrado y son refrigerados.

A continuación en la Figuras 4.49, 4.50, 4.51 y 4.52 mostramos los distintos resultados que se han obtenido del análisis sensorial realizado en zumos de naranja.

Análisis del perfil de azúcares en la autenticación de zumos de frutas

Resultados y Discusión

Observando la Figura 4.49, que representa el grado de acidez/dulzor en los zumos de naranja, vemos como los representantes de la cata le dan principalmente unos valores ácidos y agridulces a los zumos de naranja. Según éstos datos los zumos más ácidos son el ZN8 y el ZN9, esto no coincide con los valores obtenidos de pH en el laboratorio, ya que como hemos comentado anteriormente tienen un menor pH los zumos que no provienen de concentrado y son refrigerados (ZN1, ZN2 Y ZN3). Los más dulces según los representantes a la cata son ZN5, ZN6, ZN7 y ZN10. Sin embargo estos datos sí coinciden con los obtenidos de pH en el laboratorio, ya que estos 4 zumos son los que tienen un mayor valor de pH, siendo el ZN5, ZN6 y ZN7 zumos de concentrado no refrigerados. La relación entre el contenido en azúcar y el pH es la que da la percepción de dulzor.

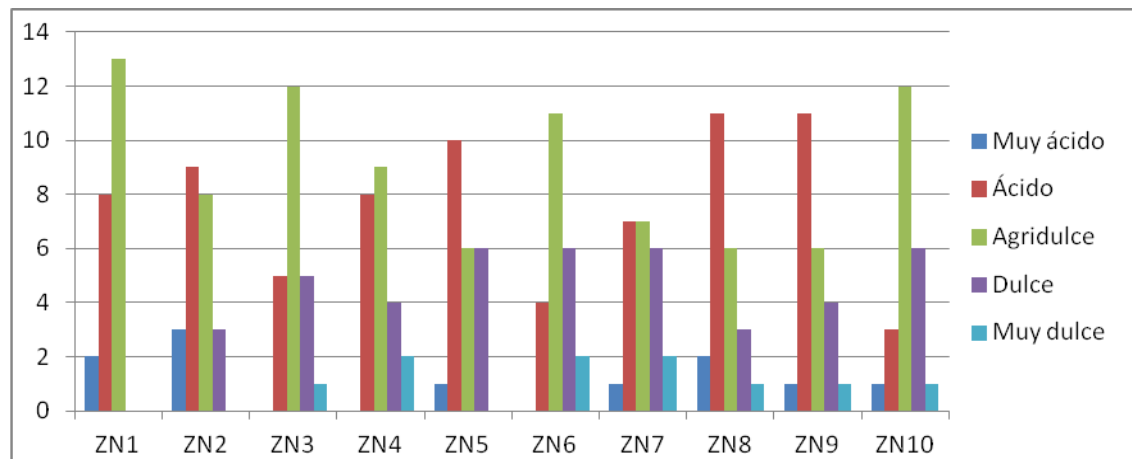


Figura 4.49. Grado de acidez valorable/dulzor en zumos de naranja.

Observando la Figura 4.50, que representa el grado de amargor en los zumos de naranja, vemos como los representantes de la cata le dan principalmente unos valores amargos y ligeramente amargos a los zumos de naranja. Según los datos el zumo más amargo es el ZN9 y le sigue el ZN1. En la gráfica se observa que los 4 zumos que provienen de concentrado y no son refrigerados (ZN4, ZN5, ZN6 y ZN7) son ligeramente amargos. Es la presencia de flavonoides característicos de los cítricos los que confieren amargor a los zumos de naranja.

Análisis del perfil de azúcares en la autenticación de zumos de frutas
Resultados y Discusión

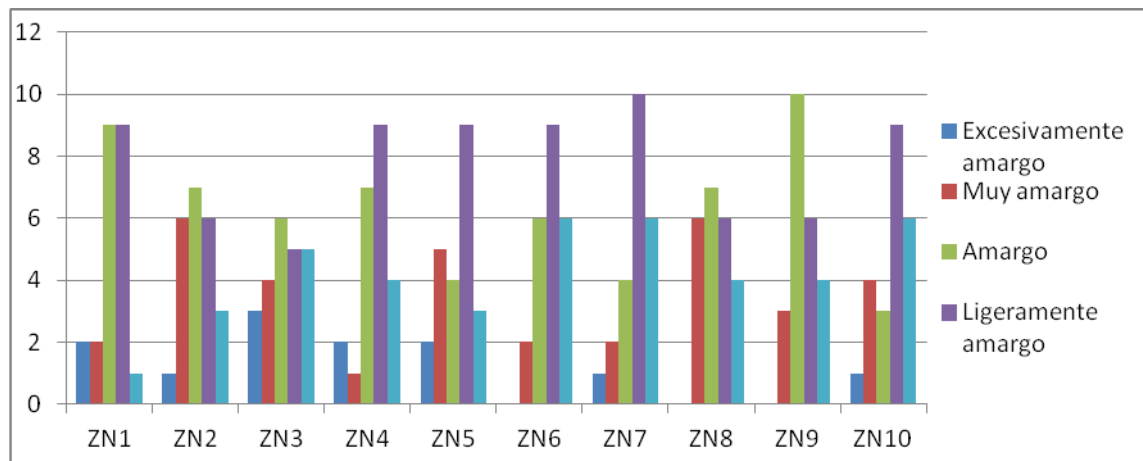


Figura 4.50. Grado de amargor en zumos de naranja.

Observando la Figura 4.51, que representa la apariencia en los zumos de naranja, vemos como los representantes de la cata le dan mayoritariamente un valor acuoso o ni acuoso-ni viscoso a los zumos. Todos los zumos tienen un valor de densidad entre 1,037 y 1,048 Kg/L, de este modo son todos acuosos ya que es casi igual a la densidad del agua.

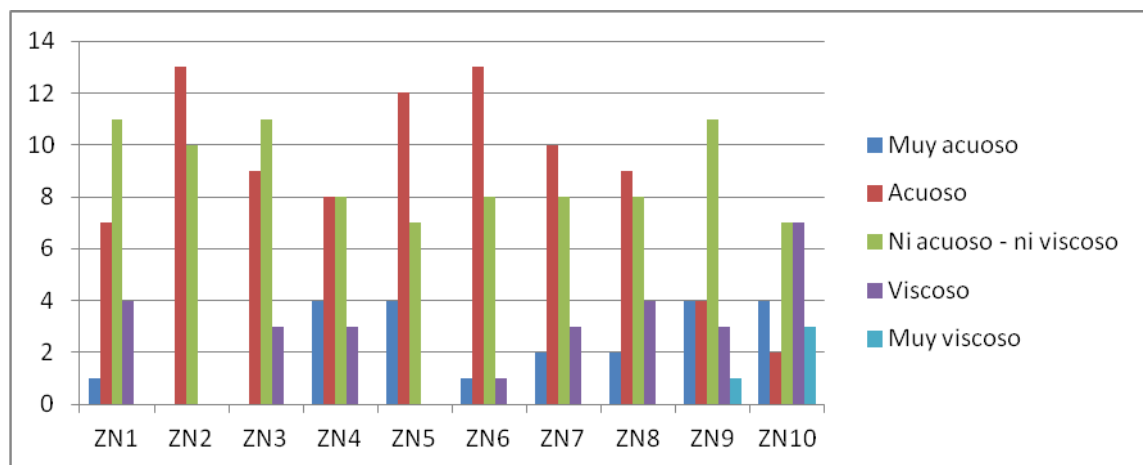


Figura 4.51. Apariencia en zumos de naranja.

Observando la Figura 4.52, que representa el grado de satisfacción en los zumos de naranja, vemos que los zumos de naranja normalmente no gustan, esto puede ser debido a que las personas están acostumbrada a tomar zumo de naranja natural realizado en casa donde el contenido en flavonoides es más bajo que en el zumo comercial. El zumo que más ha gustado es el ZN1, esto se debe a que es el que más °Brix tiene y por eso es más dulce. El zumo que menos ha gustado es el ZN9.

Análisis del perfil de azúcares en la autenticación de zumos de frutas

Resultados y Discusión

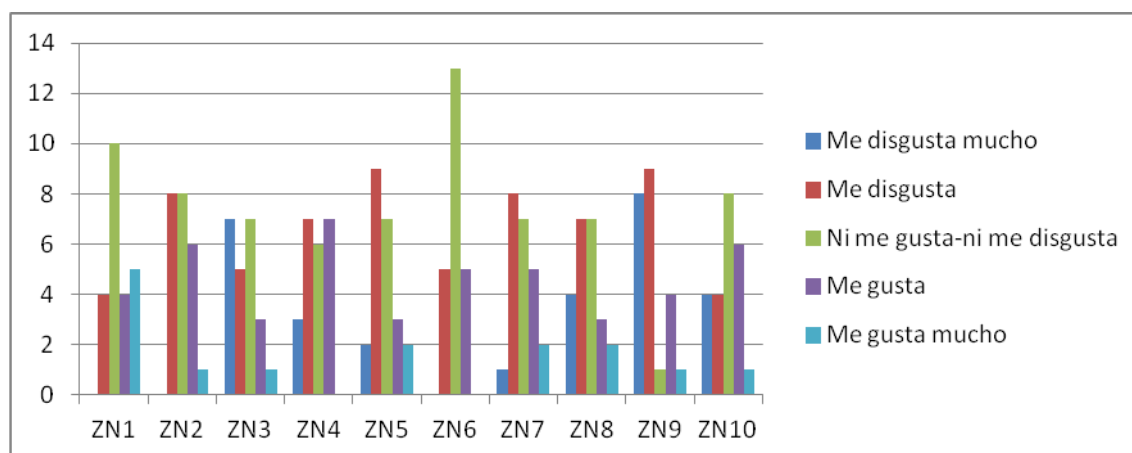


Figura 4.52. Grado de satisfacción en zumos de naranja.

Así, aunque los parámetros físico-químicos son muy parecidos entre los distintos zumos de naranja, sus propiedades sensoriales son diferentes. El consumidor se va a decidir por sus preferencias con respecto al origen del zumo y por su gusto particular del producto escogido.

- **Zumos comerciales de manzana:**

En la siguiente Tabla 4.12 podemos observar los valores de los parámetros fisicoquímicos determinados para los 5 zumos de manzana estudiados.

Tabla 4.12. Valores de los parámetros físico-químicos en los zumos comerciales de manzana.

Zumos de manzana	Clase	pH	°Brix	Densidad (Kg/L)	Viscosidad (cps)	Acidez valorable (meq/L)
ZM1	De concentrado, no refrigerado	3,30	11,3	1,046	1.574	56
ZM2		3,34	11,3	1,044	1.767	55
ZM3		3,45	11,5	1,044	1.525	30
ZM4		3,59	11,5	1,043	2.539	47
ZM5	No de concentrado, refrigerado	3,42	11,6	1,045	1.699	55

Observando la Tabla 4.12 podemos decir que no hay una diferencia muy significativa según las diferentes clases de zumos de manzana en función a los distintos parámetros analizados. Todos los zumos tienen un pH muy parecido todos los zumos. Respecto a los °Brix todos están entre 11,3 y 11,6, y los cinco

Análisis del perfil de azúcares en la autenticación de zumos de frutas

Resultados y Discusión

tienen una densidad aproximadamente de 1,045Kg/L. La viscosidad es muy parecida menos en el ZM4 que es mayor que en los demás zumos.

Las Figuras 4.53 a 4.56 recogen los resultados del estudio sensorial. Observando la Figura 4.53, que representa el grado de acidez/dulzor en los zumos de manzana, vemos como los representantes de la cata le dan principalmente unos valores agridulces y dulces a los zumos de manzana. Según los datos el zumo más dulce es el ZM4, esto coincide con los parámetros obtenidos de pH en el laboratorio, ya que como hemos comentado anteriormente tienen un valor de pH mayor que los otros zumos. Sin embargo el zumo más ácido es el ZM2 seguido del ZM1 ya que tienen un pH menor que los demás zumos. Si uno es más dulce que otro no se puede comparar con los °Brix ya que todos tienen un valor de °Brix muy parecido, la sensación de dulzor va a estar influenciada por el pH del zumo.

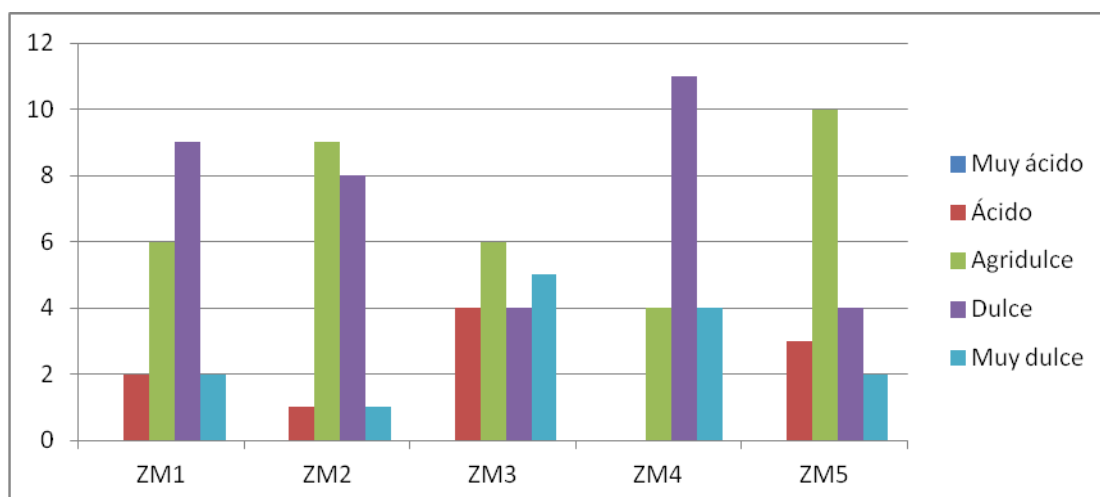


Figura 4.53. Grado de acidez/dulzor en zumos de manzana.

Observando la Figura 4.54, que representa el grado de amargor en los zumos de manzana, vemos como los representantes de la cata le dan principalmente unos valores ligeramente amargos y nada amargos a los zumos de manzana. Según los datos el zumo menos amargo es el ZM3. Los zumos ZM1 Y ZM2 son ligeramente amargos.

Análisis del perfil de azúcares en la autenticación de zumos de frutas
Resultados y Discusión

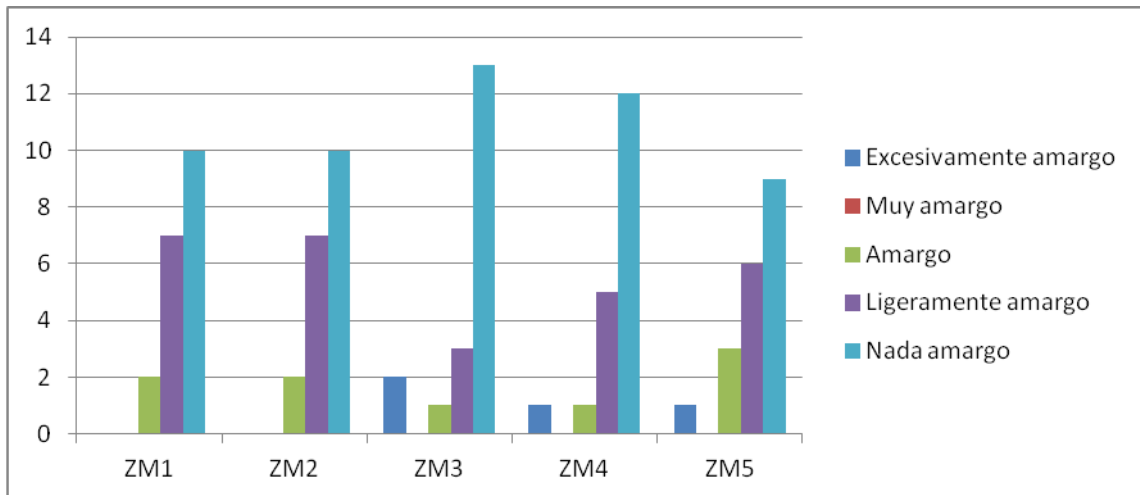


Figura 4.54. Grado de amargor en zumos de manzana.

Observando la Figura 4.55, que representa la apariencia en los zumos de manzana, vemos como los representantes de la cata le dan mayoritariamente un valor muy acuoso o acuoso a los zumos. Todos los zumos tienen un valor de densidad entre 1,043 y 1,046 Kg/L, de este modo son todos acuosos ya que es casi igual a la densidad del agua. Los zumos de manzana son los más acuosos de los estudiados ya que sufren un proceso de clarificación en su procesado.

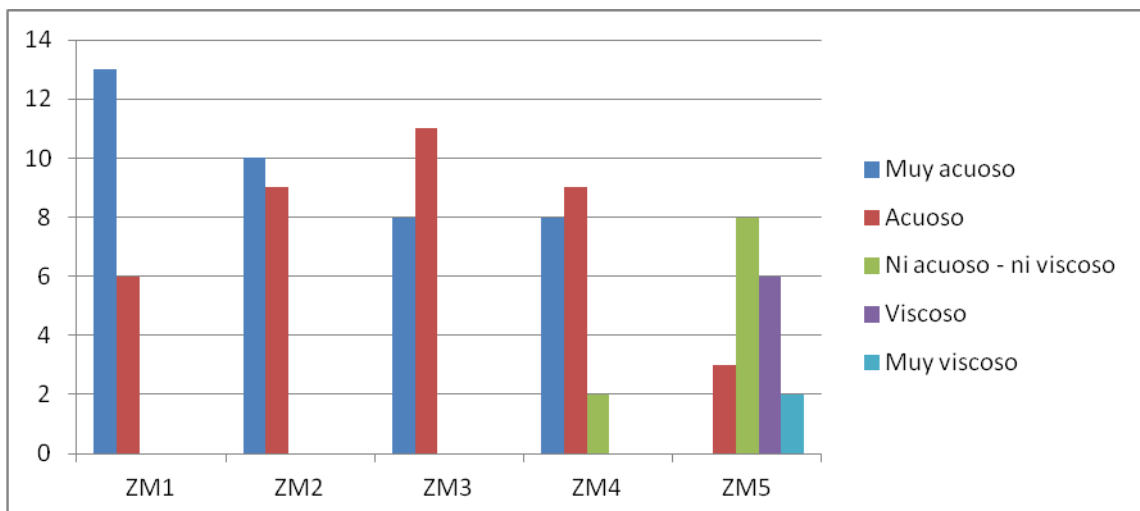


Figura 4.55. Apariencia en zumos de manzana.

Observando la Figura 4.56, que representa el grado de satisfacción en los zumos de manzana, vemos que los zumos de manzana gustan más que los de naranja. El zumo que más ha gustado es el ZM3.

Análisis del perfil de azúcares en la autenticación de zumos de frutas

Resultados y Discusión

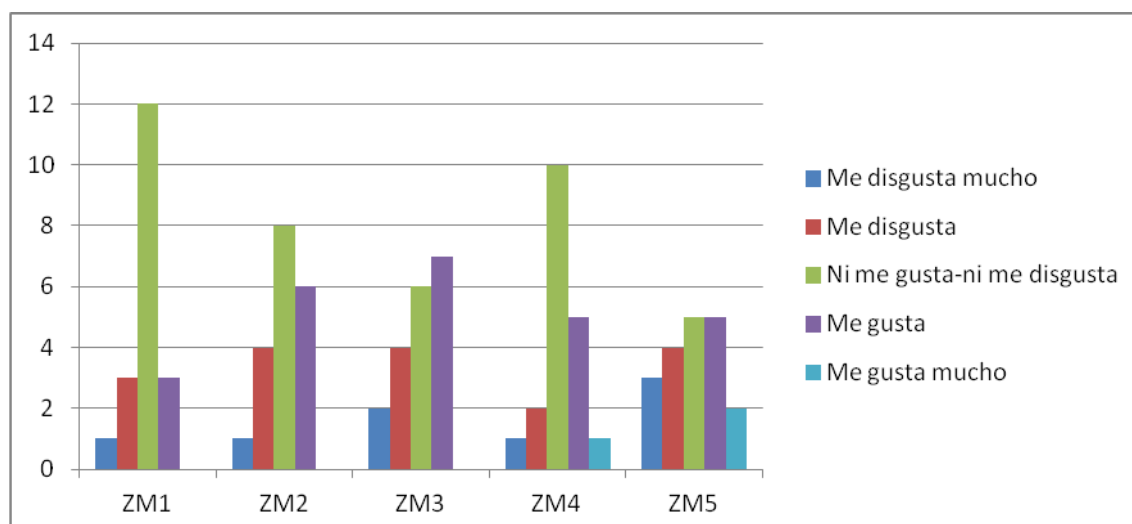


Figura 4.56. Grado de satisfacción en zumos de manzana.

Y por último, mostramos los distintos resultados que se han obtenido en el análisis sensorial realizado en zumos de piña.

- **Zumos comerciales de piña:**

La Tabla 4.13 recoge los valores de los parámetros fisicoquímicos determinados a los cinco zumos de piña analizados.

Tabla 4.13. Valores de los parámetros físico-químicos de los zumos comerciales de piña.

Zumos de piña	Clase	pH	°Brix	Densidad (Kg/L)	Viscosidad (cps)	C _{H+} (mmoles de H ⁺ /L de zumo)
ZP1	De concentrado, no refrigerado	3,72	12,8	1,046	2,488	86
ZP2		3,76	13,1	1,045	2,486	80
ZP3	No de concentrado, refrigerado	3,54	13,0	1,046	2,486	85
ZP4		3,57	12,3	1,043	2,529	80
ZP5	No de concentrado, no refrigerado	3,68	12,1	1,044	1,615 (filtrado)	86

Observando la Tabla 4.13 podemos decir que no hay una diferencia muy significativa según las diferentes clases de zumos de piña en función a los distintos parámetros analizados. Podemos decir que tienen un menor pH los zumos que no provienen de concentrado y son refrigerados, y tienen un mayor pH aquellos que provienen de concentrado y no son refrigerados. Respecto a los °Brix todos están entre 12 y 13, y todos tienen una densidad

Análisis del perfil de azúcares en la autenticación de zumos de frutas

Resultados y Discusión

aproximadamente de 1,045Kg/L. La viscosidad es la misma para todos menos para el ZP5 ya que éste fue filtrado antes de pasarlo por el viscosímetro porque se atrancaba.

A continuación mostramos los distintos resultados que se han obtenido en el análisis sensorial realizado.

Observando la Figura 4.57, que representa el grado de acidez/dulzor en los zumos de piña, vemos como los representantes de la cata le dan principalmente unos valores agridulces y dulces a los zumos de piña. Según los datos el zumo más dulce es el ZP2, esto coincide con los parámetros obtenidos de pH en el laboratorio, ya que como hemos comentado anteriormente los zumos que provienen de concentrado y no refrigerados tienen un valor de pH mayor que los otros. Sin embargo el zumo más ácido es el ZP4 ya que tienen un pH menor que los demás zumos no proviene de concentrado y es refrigerado. Si uno es más dulce que otro no se puede comparar con los °Brix ya que todos tienen un valor de °Brix muy parecido, sino que la percepción de dulzor se ve influenciada por el pH del zumo.

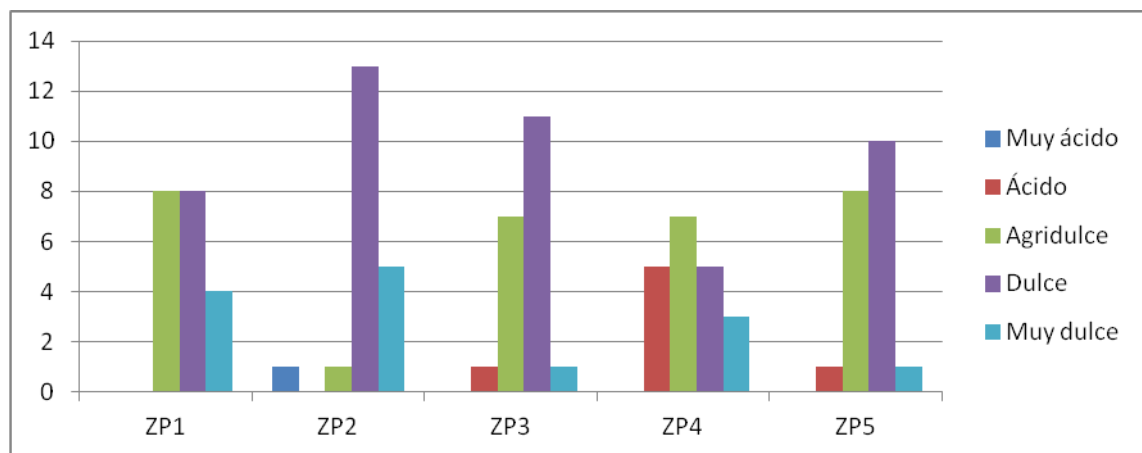


Figura 4.57. Grado de acidez/dulzor en zumos de piña.

Observando la Figura 4.58, que representa el grado de amargor en los zumos de piña, vemos que el ZP2 no es amargo y los demás son ligeramente amargos.

Análisis del perfil de azúcares en la autenticación de zumos de frutas
Resultados y Discusión

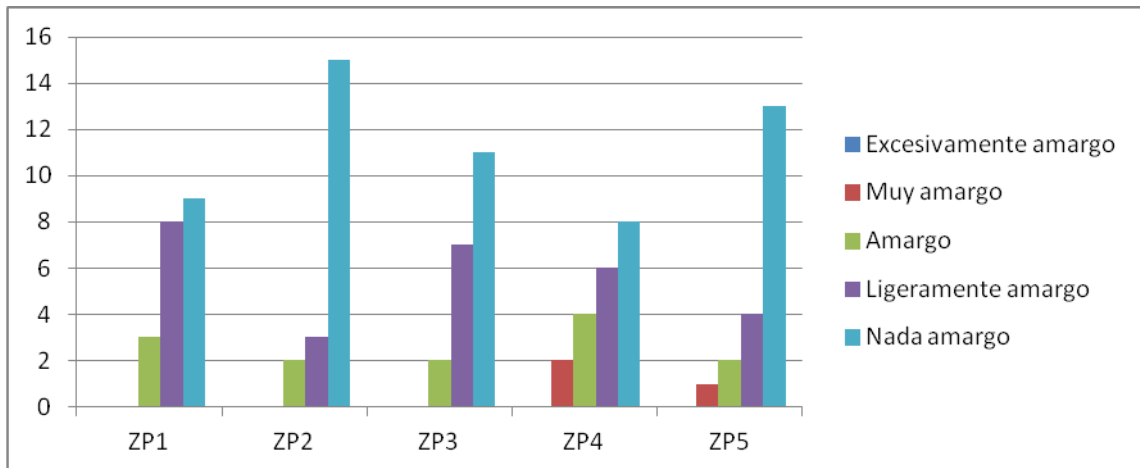


Figura 4.58. Grado de amargor en zumos de piña.

Observando la Figura 4.59, que representa la apariencia en los zumos de piña, vemos como los representantes de la cata le dan mayoritariamente un valor acuoso o ni acuoso - ni viscoso a los zumos. Todos los zumos tienen un valor de densidad entre 1,043 y 1,046 Kg/L, de este modo son todos acuosos ya que es casi igual a la densidad del agua. El ZP4 según los representantes de la cata es el más viscoso, comparándolo con los datos del laboratorio es el que mayor viscosidad tiene.

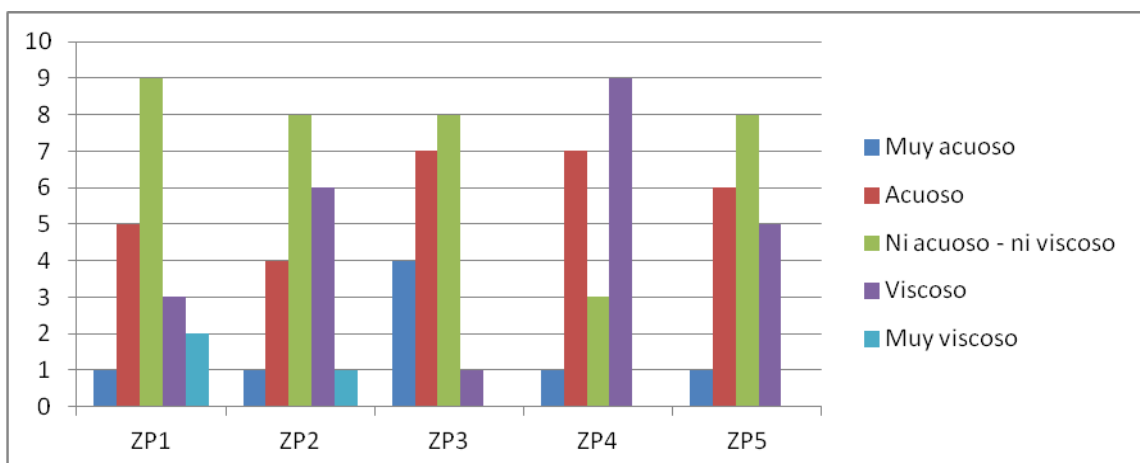


Figura 4.59. Apariencia en zumos de piña.

Observando la Figura 4.60, que representa el grado de satisfacción en los zumos de piña. Los zumos que más han gustado han sido el ZP1 y el ZP2, estos zumos son los que provienen de concentrado y no son refrigerados.

Análisis del perfil de azúcares en la autentificación de zumos de frutas

Resultados y Discusión

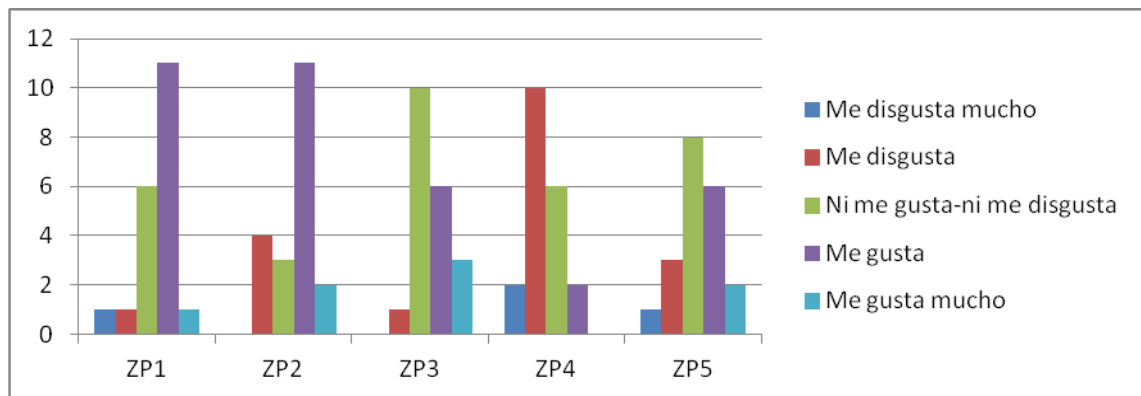


Figura 4.60. Grado de satisfacción en zumos de piña.

En el conjunto de este estudio de zumos comerciales se deduce que aún siendo necesario determinar los parámetros físico-químicos de un zumo, los valores de estos parámetros no tienen porqué estar relacionados con las percepciones sensoriales del consumidor. Éste se decidirá por un producto u otro según su poder adquisitivo, la exigencia sobre el origen del producto y el gusto personal por un producto u otro.

Es interesante observar como el zumo de naranja ha sido menos apreciado por el panel de expertos, que han calificado mejor los zumos de manzana y piña. Sin embargo según los estudios de mercado es el zumo de naranja el más vendido a nivel mundial y también en España.

También es curioso observar como los zumos obtenidos a partir de concentrado, que se comercializan no refrigerados y son los más económicos de todos los analizados, han sido los mejor valorados en el grado de satisfacción.

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE CARTAGENA
ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA
AGRONÓMICA



PROYECTO FIN DE CARRERA
**Análisis del perfil de azúcares en la
autenticación de zumos de frutas**

Conclusiones



5. CONCLUSIONES

1. Las mejores condiciones para el análisis de zumos de naranja, manzana y piña por HPAEC-PAD son: como fase móvil NaOH 80 Mm a un flujo de 0,70ml/min, como fase estacionaria una columna de intercambio aniónico metrosep-carb1 5 μ m X 150mm x4mm, termostatzada a 32°C. Un volumen de muestra 10 μ l y el sistema de detección por amperometría de pulson con pulsos de 50mV.
2. En la preparación de la muestra, los zumos concentrados, jarabes de glucosa y azúcares invertidos se deben diluir por 1000, mientras que los zumos naturales y los comerciales se deben diluir por 200.
3. El método de análisis utilizado permite determinar el perfil de azúcares de jarabes de glucosa y azúcar invertido. En las muestras de jarabes de glucosa analizados se ha comprobado como se puede modificar la relación glucosa/fructosa según el grado de isomerización de glucosa.
4. El perfil de azúcares permiten diferenciar entre azúcares invertidos y jarabes de glucosa. La relación de azúcares permite diferenciar el grado de isomerización de los jarabes de glucosa.
5. Mediante el perfil de azúcares obtenido por HPAEC_PAD se puede identificar y autenticar un zumo de naranja por la presencia de mioinositol, y uno de manzana por que tiene como característica el pico de sorbitol. El perfil de azúcares del zumo de piña contiene glucosa fructosa y sacarosa sin mostrar un compuesto característico detectable en este análisis.
6. El análisis por HPAED-PAD permite detectar azúcares añadidos en un sistema modelo de zumo reconstituido a partir de concentrado, con independecia de la dilución de la muestra, utilizando la relación de azúcares.

Análisis del perfil de azúcares en la autenticación de zumos de frutas

Conclusiones

7. Los zumos comerciales se pueden analizar por HPAED-PAD y comprobar si se han añadido azúcares analizando la relación de glucosa/fructosa y glucosa/sacarosa que presentan.

8. La percepción sensorial del consumidor no está determinada por el valor de las propiedades físico-químicas de un zumo y tampoco está determinada por el origen del zumo. El consumidor escogerá un producto u otro según sus preferencias de origen del zumo y sus gustos personales.

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE CARTAGENA
ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA
AGRONÓMICA



PROYECTO FIN DE CARRERA
**Análisis del perfil de azúcares en la
autenticación de zumos de frutas**

Bibliografía



6. BIBLIOGRAFÍA

- Andersen, R. & Sørensen, A. (2000) Separation and determination of alditols and sugars by high-pH anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *J. Chromatogr. A* **897**, 195-204.
- Baldwin, R. P. (1999) Electrochemical determination of carbohydrates: Enzyme electrodes and amperometric detection in liquid chromatography and capillary electrophoresis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **19**, 69-81.
- Borges, G; Crozier, A. *Food Chemistry*, 135 (2012), 1863-1867.
- Bruggink, C., Maurer, R., Hermann, H., Cavalli, S. & Hoefler, F. (2005) Analysis of carbohydrates by anion exchange chromatography and mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1085**, 104-109.
- Casella, I. G., Guascito, M. R. & Cataldi, T. R. I. (1999) Electrocatalysis and amperometric detection of alditols and sugars at a gold-nickel electrode in anion-exchange chromatography. *Anal. Chim. Acta* **398**, 153-160.
- Cataldi, T. R. I., Campa, C., Casella, I. G. & Bufo, S. A. (1999) Determination of Maltitol, Isomaltitol, and lactitol by High-pH Anion Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 157-163.
- Cataldi, T. R. I., Campa, C. & De Benedetto, G. E. (2000) Carbohydrate analysis by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection: the potential is still growing. *Fresenius J Anal Chem* **368**, 739-758.
- Cataldi, T. R. I., Margiotta, G. & Zambonin, C. G. (1998) Determination of sugars and alditols in food samples by HPAEC with integrated pulsed amperometric detection using alkaline eluents containing barium or strontium ions. *Food Chem.* **62**, 109-115.
- Chen, Z. L. & Hibbert, D. B. (1997) Simultaneous amperometric and potentiometric detection of sugars, polyols and carboxylic acids in flow systems using copper wire electrodes. *J. Chromatogr. A* **766**, 27-33.
- Colón, L. A., Dadoo, R. & Zare, R. N. (1993) Determination of carbohydrates by capillary zone electrophoresis with amperometric detection at a Cooper microelectrode. *Anal. Chem.* **65**, 476-481.
- Coquet, A., Haerdi, W., Degli, R. & Veuthey, J. L. (1994) Determination of sugars by liquid chromatography with post-column catalytic derivatization and fluorescence detection. *Chromatographia* **38**, 12-16.
- Cordella, C., Moussa, I., Martel, A. C., Sbirrazzuoli, N. & Lizzani-Couvelier, L. (2002) Recent developments in food characterization and adulteration detection: technique-oriented perspectives. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 1751-1764.

- Corradini, C., Canali, G., Cogliandro, E. & Nicoletti, I. (1997) Separation of alditols of interest in food products by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *J. Chromatogr. A* **791**, 343-349.
- Corradini, C., Canali, G. & Nicoletti, I. (1997) Application of HPAEC-PAD to carbohydrate analysis in food products and fruit juices. *Sem. Food Anal.* **2**, 99-111.
- Day, M. P., Correia, P. & Hammond, D. A. (2001) ¹³C-IRIS: an improved method to detect the addition of low levels of C4-derived sugars to juices. *Journal of AOAC Int.* **84**, 957-963.
- Dionex Corp. Analysis of carbohydrates by High Performance Anion Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection (HPAE-PAD). *Dionex Technical Note* **20**, 1-13.
- Dionex Corp. Analysis of fruit juice adulterated with medium invert sugar from beets. *Dionex Application Note* **82**, 1-4.
- Doyon, G., Gaudreau, G., St-Gelais, D., Beaulieu, Y. & Randall, C. J. (1991) Simultaneous HPLC determination of organic acids, sugars and alcohols. *Can. Inst. Sci. Technol.* **24**, 87-94.
- Edwards, P. & Haak, K. K. (1983) *Int. Lab.* **38**, Junio.
- Eggleston, G. & Clarke, M. A. (1997) Applications of HPAE-PAD in the sugar industry. *Sem. Food Anal.* **2**, 119-127.
- Elkins, E. R., Lyon, R., Huang, C. J. & Matthys, A. (1997) Characterization of commercially produced pineapple juice concentrate. *J. Food Comp. Anal.* **10**, 285-298.
- Fermier, A. M., Gostkowski, M. L. & Colon, L. A. (1996) Rudimentary capillary-electrode alignment for capillary electrophoresis with electrochemical detection. *Anal. Chem.* **68**, 1661-1664.
- Fermier, A. M. & Colon, L. A. (1996) Capillary electrophoresis with constant potential amperometric detection using a nickel microelectrode for the detection of carbohydrates. *J. High Resolut. Chromatogr.* **19**, 613-616.
- Fu, C., Song, L. & Yuzki, F. (1998) Simultaneous determination of sugars and organic acids by co-electroosmotic capillary electrophoresis with amperometric detection at a disk-shaped copper electrode. *Anal. Chim. Acta* **371**, 81-87.
- Fügél, R; Carle, R; Schieber, A. Trends in Food Science & Technology, 16 (2005), 433-441.
- García-Alonso, F.J. (2005). Tesis Doctoral Europea. Evaluación *in vitro* e *in vivo* de la funcionalidad de un producto rico en antioxidantes.
- García-Wass, F; Hammond, D; Mottram, D.S; Gutteridge, C.S. Food Chemistry, 69 (2000), 215-220.

- Gey, M. H., Unger, K. K. & Battermann, G. (1996) HPLC analysis of carbohydrates on POLYSPHER®CH OH columns using pulsed amperometric detection (PAD) with sodium hydroxide as post column detection reagent. *Fresenius J Anal Chem* **356**, 339-343.
- Greenway, G. M. & Kometa, N. (1995) The determination of sugars in beverages and medicines using on-line dialysis for sample preparation. *Food Chem.* **53**, 105-110.
- Hammond, D. A. (2001) Synergy between liquid chromatographic-pulsed amperometric detection and capillary-gas chromatographic methods for the detection of juice adulteration. *J. AOAC Int.* **84**, 964-975.
- Huang, X., Pot, J. J. & Kok, W. T. (1995) Determination of Sugars by Liquid Chromatography and Amperometric Detection with a Cuprous Oxide Modified Electrode. *Chromatographia* **40**, 684-689.
- Huang, X. & Kok, W. T. (1995) Determination of sugars by capillary electrophoresis with electrochemical detection using cuprous oxide modified electrodes. *J. Chromatogr. A* **707**, 335-342.
- Hughes, S. & Johnson, D. C. (1981) Amperometric detection of simple carbohydrates at platinum electrodes in alkaline solutions by application of a triple-pulse potential waveform. *Anal. Chim. Acta* **132**, 11-22.
- Jamin, E., Gonzalez, J., Remaud, G., Naulet, N., Martin, G. G., Weber, D., Rossmann, A. & Schmidt, H. L. (1997) Improved detection of sugar addition to apple juices and concentrates using internal standard C IRMS. *Anal. Chim. Acta* **347**, 359-368.
- Johnson, D. C. & LaCourse, W. R. (1990) Liquid chromatography with pulsed electrochemical detection at gold and platinum electrodes. *Anal. Chem.* **62**, 589-597.
- Kakemoto, M., Murakami, K. & Ogawa, H. (1996) Simultaneous determination of ethanol and glucose by HPLC with an immobilized enzyme membrane electrode. *Nippon Kagaku Kaishi* 141-145.
- Klampfl, C. W. & Buchberger, W. (2001) Determination of carbohydrates by capillary electrophoresis with electrospray-mass spectrometric detection. *Electrophoresis* **22**, 2737-2742.
- Klockow, A., Paulus, A., Figueiredo, V., Amado, R. & Widmer, H. M. (1994) Determination of carbohydrates in fruit juices by capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **680**, 187-200.
- LaCourse, W. R., Dasenbrock, C. O. & Zook, C. M. (1997) Fundamentals and applications of pulsed electrochemical detection in food analysis. *Sem. Food Anal.* **2**, 5-41.
- LaCourse, W. R. & Owens, G. S. (1996) Pulsed electrochemical detection of nonchromophoric compounds following capillary electrophoresis. *Electrophoresis* **17**, 310-318.

- Low, N.H. (1996) Determination of fruit juice authenticity by capillary gas chromatography with flame ionization detection. *J. AOAC Int.* **79**, 724-737.
- Low, N. H. & Wudrich, G. G. (1993) Detection of inexpensive sweetener addition to grapefruit juice by HPLC-PAD. *J. Agric. Food Chem.* **41**, 902-909.
- Lu, B., Stefansson, M. & Westerlund, D. (1995) Indirect detection of saccharides in reversed-phase liquid-chromatography with highly alkaline mobile phases. *J. Chromatogr. A* **697**, 317-327.
- Lu, W. & Cassidy, R. M. (1993) Pulsed amperometric detection of carbohydrates separated by capillary electrophoresis. *Anal. Chem.* **65**, 2878-2881.
- Luo, P., Luo, M. Z. & Baldwin, R. P. (1993) Determination of Sugars in Food Products. *J. Chem. Educ.* **70**, 679-681.
- Martin, G. G., Hanote, V., Lees, M. & Martin, Y. L. (1996) Interpretation of combined ²H-SNIF/NMR and ¹³C SIRA/MS analysis of fruit juices to detect added sugar. *J. AOAC Int.* **79**, 62-72.
- Martínez Montero, C; Rodríguez Doderó, M.C; Guillén Sánchez, D.A; Barroso, C.G. *Chromatographia*, 59 (2004), 15-30.
- Noe, C. R., Lachmann, B., Möllenbeck, S. & Richter, P. (1999) Determination of reducing sugars in selected beverages by capillary electrophoresis. *Z Lebensm Unters Forsch A* **208**, 148-152.
- O`Shea, T. J. & Lunte, S. M. (1994) Chemically modified microelectrodes for capillary electrophoresis/electrochemistry. *Anal. Chem.* **66**, 307-311.
- Perrot, N; Ioannou, I; Allais, I; Curt, C; Hossenlopp, J; Trystram, G. *Fuzzy Sets and Systems*, 157 (2006), 1145-1154.
- Ratsimba, V., García Fernández, J.M., Defaye, J., Nigay, H. & Voilley, A. (1999) Qualitative and quantitative evaluation of mono- and disaccharides in D-fructose, D-glucose and sucrose caramels by gas-liquid chromatography-mass spectrometry Di-D-fructose dianhydrides as tracers of caramel authenticity. *J. Chromatogr. A* **844**, 283-293.
- Rocklin, R. D. & Pohl, C. A. (1983) Determination of carbohydrates by anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *J. Liq. Chromatogr.* **6**, 1577-1590.
- Schieber, A.; Stintzing, F.C. & Carle, R. (2001) By-products of plant food processing as a source of functional compounds - recent developments. *Trends in Food Science & Technology*, 12, 401-413.
- Silva, B. M., Seabra, R. M., Andrade, P. B., Oliveira, M. B. & Ferreira, M. A. (1999) Adulteration of fruit juice by addition of sugars: A review. *Cienc. Tecnol. Aliment.* **2**, 184-191.
- Silverstein, R.M., Bassler, G.C. & Morrill, T.C. (1991) "Spectrometric identification of organic compounds" 5^a ed., Wiley, Nueva York, E.E.U.U.

- Skoog, D.A.; Holler, F.J.; Nieman, T.A. Principios de análisis instrumental. *Ed. Mc Graw-Hill*. Madrid. **2003**, pp.786.
- Suzuki, J., Umeda, Y., Kondo, A. & Kato, I. (1992) Analysis of oligosaccharides by on-line high-performance liquid chromatography and ion-spray mass spectrometry. *Anal. Biochem.* **207**, 203-207.
- Swallow, K. W., Low, N. H. & Petrus, D. R. (1991) Detection of orange juice adulteration with beet medium invert sugar using anion-exchange liquid chromatography with pulsed amperometric detection. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **74**, 341-345.
- Silva, B.M; Seabra R.M; Andrade P.B; Oliveira M.B; Ferreira M.A. (1999) Adulteration of fruit juice by addition of sugars, 184-191.
- Tsang, W.S.C., Clarke, M.A. & Cargel, G.L.R. (1991) Identification of sweeteners in beverages. *Publication of Technical Papers and Proceedings of the Annual Meeting of Suga Industry Technologists* **50**, 13-25.
- Van Riel, J. & Olieman, C. (1991) Selectivity control in the anion-exchange chromatographic determination of saccharides in dairy products using pulsed amperometric detection. *Carbohydr. Res.* **215**, 39-46.
- Vérette, E., Qian, F. & Mangani, F. (1995) On-line dialysis with high-performance liquid chromatography for the automated preparation and analysis of sugars and organic acids in foods and beverages. *J. Chromatogr. A* **705**, 195-203.
- Voegel, P. D., Zhou, W. & Baldwin, R. P. (1997) Integrated capillary electrophoresis/electrochemical detection with metal film electrodes directly deposited onto the capillary tip. *Anal. Chem.* **69**, 951-957.
- Wang, J., Sporns, P. & Low, N. H. (1999) Analysis of food oligosaccharides using MALDI-MS: quantification of fructooligosaccharides. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 1549-1557.
- Ye, J. & Baldwin, R.P. (1993) Amperometric detection in capillary electrophoresis with normal size electrodes. *Anal. Chem.* **65**, 3525-3527.
- Ye, J. & Baldwin, R. P. (1994) Determination of carbohydrates, sugar acids and alditols by capillary electrophoresis and electrochemical detection at a copper electrode. *J. Chromatogr. A* **687**, 141-148.
- Yuan, J.-P. & Chen, F. (1999) Simultaneous separation and determination of sugars, ascorbic acid and furanic compounds by HPLC-dual detection. *Food Chem.* **64**, 423-427.
- Zemann, A., Nguyen, D. T. & Bonn, G. (1997) Fast separation of underivatized carbohydrates by coelectroosmotic capillary electrophoresis. *Electrophoresis* **18**, 1142-1147.
- Zhong, M. & Lunte, S. M. (1996) Integrated on-capillary electrochemical detector for capillary electrophoresis. *Anal. Chem.* **68**, 2488-2493.
- www.codexalimentarius.org

- www.aijn.org
- www.upct.es
- www.infoagro.com
- www.crisoninstruments.com