

Universidad de Costa Rica
Facultad de Ciencias
Escuela de Química

**“Recomendación de los métodos analíticos para el
establecimiento de un reglamento técnico en la caracterización
de los jugos de naranja”.**

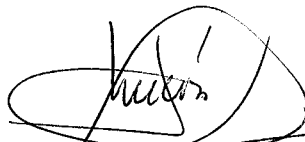
**Proyecto de graduación presentado como requisito parcial para optar por
el grado de Licenciatura Química.**

Ana Yansy Vargas Avila

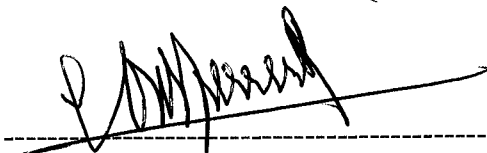
Ciudad Universitaria “Rodrigo Facio”

1999

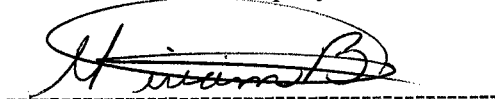
Este proyecto de graduación ha sido aceptado por la Escuela de Química de la Facultad de Ciencias Básicas de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado de Licenciatura Química.



Lic. Jorge Chacón Solano.
Director de la Escuela de Química.



MSc. Carlos Herrera Ramírez.
Director del proyecto.



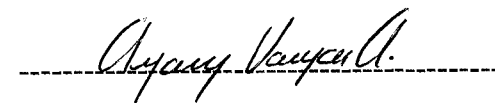
Lic. Miriam Barquero Quirós.
Asesora del proyecto.



Lic. Carlos Picado Salazar.
Asesor del proyecto.



Lic. Eduardo Obando Fonseca
Miembro del Tribunal.



Ana Yansy Vargas Avila.
Postulante.

RESUMEN

El jugo de naranja es un producto de gran demanda comercial en Costa Rica, sin embargo, aún no se cuenta con un Reglamento Técnico que regule la calidad de los mismos. Debido a que se debe de contar con regulaciones sobre la calidad de esta bebida; tanto para los productores como para la Oficina Nacional de Normas y Unidades de Medidas (ONNUM), que es el ente encargado de velar por la protección del consumidor; se propuso el siguiente proyecto con el fin de llegar a obtener un perfil de calidad para jugos de naranja procesados en Costa Rica, que pueda ser aceptado como un antecedente para el reglamento técnico de estos jugos.

En este trabajo se determinaron los parámetros de calidad más importantes para caracterizar los jugos de naranja. Entre estos destacan la acidez (titulable e iónica), los sólidos solubles y totales, cenizas, colorantes, azúcares reductores y no reductores y vitamina C; estos dos últimos se determinaron mediante cromatografía líquida de alta resolución, los métodos para ellos se tuvieron que optimizar para ajustarlos a las condiciones experimentales.

Los resultados obtenidos de los jugos de naranja se compararon con los reportados por Normas Internacionales tales como las ICAITI, la BSEN y las del Codex Alimentarius para dicha bebida, dando como resultado lo siguiente:

- De las quince muestras de jugo de naranja analizadas, solo una de ellas (MN), se encuentra por debajo del límite permisible de los grados Brix (10 °Brix); por otro lado la muestra HO es la única que cumple con la cantidad mínima de vitamina C (350 mg/Kg), recomendado por la norma ICAITI.
- De los análisis de pH y acidez total, la mayoría de los valores encontrados para los jugos de naranja, se encuentra por debajo del límite inferior permisible, la media encontrada para la acidez fue de 0.65 % (m/v ácido cítrico anhidro) y la media encontrada para la determinación del pH fue de 3.26
- De los análisis realizados de índice de maduración, se encontró que dos de las muestras (MN y RDB) presentan valores totalmente desviados al intervalo recomendado por la norma, el cual está entre (7 – 18) °Brix/acidez titulable (expresada en g de ácido cítrico anhidro).
- Se encontró que los tres refrescos de naranja analizados, contienen colorantes sintéticos, de esta manera las muestras CN y LF presentan los colorantes Tartrazina y Amarillo ocazo y la muestra RDB además de presentar los dos colorantes anteriores también contiene Rojo No. 40.

DEDICATORIA

A Dios padre, quién con su ayuda espiritual, fortaleza y confianza, me levantaron en los momentos en que creí caer.

A mis padres, Magda y Luis Dalay, quienes con su esfuerzo, comprensión y confianza me dieron la mejor herencia, cual es, culminar con éxito mi carrera profesional, que Dios los bendiga siempre.

A mis abuelos, Renán y Teresa, a quienes les debo el sacrificio y la humildad que han hecho posible este momento.

AGRADECIMIENTOS

Al M.S.c Carlos Herrera Ramírez, la dirección de mi tesis, lo hizo de la mejor forma y de la manera más desinteresada con el cariño y estima que siempre me demostró.

Al Lic. Eduardo Obando, y al M.S.c Marco Julio Lobo, ejemplos de sencillez, humildad, esmero y dedicación. Gracias por su invaluable ayuda prestada durante el proceso de esta investigación.

Al Lic. Carlos Picado, gran conocedor de la materia, gracias por el tiempo que me dedicó.

A la Lic. Mirian Barquero, gracias por sus consejos y aportes a la investigación.

A mis hermanos y tíos, gracias por su confianza, apoyo y amor

A Alfonso por su invaluable ayuda y su confianza depositada en mí.

A mis amigos de la Escuela de Química, quienes siempre estuvieron conmigo dándome su apoyo y amistad. Gracias amigos.

INDICE GENERAL

| | |
|---|-----|
| Tribunal Examinador | ii |
| Resumen | iii |
| Dedicatoria | iv |
| Agradecimientos | v |
| 1.Introducción | 1 |
| 1.1 Generalidades..... | 1 |
| 1.2 Definición de jugo de naranja..... | 2 |
| 1.3 Composición química del jugo de naranja..... | 2 |
| 1.4 Pasteurización del jugo de naranja..... | 3 |
| 1.5 La vitamina C en el jugo de naranja..... | 4 |
| 1.6 Control de Calidad..... | 7 |
| 1.7 Metodología Analítica recomendada para el análisis de jugos de naranja..... | 7 |
| 1.7.1 Sólidos totales..... | 7 |
| 1.7.2 Determinación de cenizas..... | 7 |
| 1.7.3 Sólidos solubles..... | 7 |
| 1.7.4 pH y acidez titulable..... | 8 |
| 1.7.5 Determinación de los azúcares reductores y no reductores..... | 8 |
| 1.7.6 Determinación de vitamina C..... | 8 |
| 1.7.7 Determinación cualitativa de colorantes..... | 10 |
| 1.8 Normas existentes..... | 10 |
| 2.Materiales y Métodos | 12 |
| 2.1 Muestreo y preparación de la muestra..... | 12 |
| 2.2 Equipo y metodología utilizada..... | 12 |
| 2.3 Determinación de ácido ascórbico (vitamina C)..... | 13 |
| 2.3.1 Preparación de las muestras..... | 13 |
| 2.3.2 Preparación de los patrones..... | 13 |
| 2.3.3 Equipo y condiciones cromatográficas..... | 13 |
| 2.3.4 Determinación de las figuras de mérito..... | 13 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 2.3.4.1 | Determinación del ámbito lineal..... | 13 |
| 2.3.4.2 | Veracidad del método..... | 14 |
| 2.3.4.3 | Precisión..... | 14 |
| 2.3.4.4 | Exactitud..... | 14 |
| 2.3.4.5 | Límites de detección y de cuantificación..... | 14 |
| 2.3.4.6 | Ambito de trabajo..... | 14 |
| 2.3.4.7 | Sensibilidad..... | 14 |
| 2.3.5 | Cálculos..... | 14 |
| 2.4 | Determinación de azúcares por HPLC..... | 15 |
| 2.4.1 | Preparación de las muestras..... | 15 |
| 2.4.2 | Preparación de los patrones..... | 15 |
| 2.4.3 | Equipo y condiciones cromatográficas..... | 15 |
| 2.4.4 | Determinación de las figuras de mérito..... | 15 |
| 2.4.4.1 | Determinación del ámbito lineal..... | 15 |
| 2.4.4.2 | Veracidad del método..... | 16 |
| 2.4.4.3 | Precisión..... | 16 |
| 2.4.4.4 | Exactitud..... | 16 |
| 2.4.4.5 | Límites de detección y de cuantificación..... | 16 |
| 2.4.4.6 | Ambito de trabajo..... | 16 |
| 2.4.4.7 | Sensibilidad..... | 16 |
| 2.4.5 | Cálculos..... | 16 |
| 3. | Resultados cromatográficos y discusión..... | 17 |
| 3.1 | Validación del método..... | 17 |
| 3.1.1 | Validación del método de vitamina C..... | 17 |
| 3.1.1.1 | Estabilidad del ácido ascórbico..... | 17 |
| 3.1.1.2 | Comportamiento espectroscópico..... | 17 |
| 3.1.1.3 | Optimización del método de vitamina C..... | 18 |
| 3.1.1.4 | Estudio de estabilidad de la vitamina C..... | 19 |
| 3.1.1.5 | Selectividad del método de vitamina C..... | 20 |
| 3.1.1.6 | Precisión del método de vitamina C..... | 21 |
| 3.1.1.7 | Linealidad y ámbito de trabajo..... | 24 |
| 3.1.1.8 | Límites de detección y de cuantificación..... | 26 |
| 3.1.1.9 | Exactitud..... | 27 |
| 3.1.2 | Validación del método de azúcares..... | 30 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 3.1.2.1 | Determinación de las condiciones óptimas para la determinación de azúcares..... | 30 |
| 3.1.2.2 | Selectividad del método de vitamina C..... | 32 |
| 3.1.2.3 | Precisión del método de vitamina C..... | 32 |
| 3.1.2.4 | Linealidad y ámbito de trabajo..... | 37 |
| 3.1.2.5 | Límites de detección y de cuantificación..... | 39 |
| 3.1.2.6 | Exactitud..... | 39 |
| 3.3 | Resultados obtenidos con los jugos de naranja..... | 42 |
| 3.4 | Propuesta parcial de norma..... | 65 |
| 4.0 | Conclusiones y Recomendaciones..... | 71 |
| 4.1 | Conclusiones..... | 71 |
| 4.2 | Recomendaciones..... | 72 |
| 5.0 | bibliografía..... | 73 |
| 6.0 | Apéndice..... | 77 |

INDICE DE CUADROS

| | |
|--|----|
| Cuadro I. Acidos libres y combinados en el jugo de naranja..... | 3 |
| Cuadro II. Condiciones de pasteurización para la inactivación de pectinmetil esterasa en los jugos de naranja..... | 4 |
| Cuadro III. Parámetros físicos y químicos en el jugo de naranja, según la norma ICAITI 34008..... | 11 |
| Cuadro IV. Resolución de los picos de EDTA y vitamina C a los diferentes flujos de la fase móvil..... | 19 |
| Cuadro V. Datos obtenidos para la determinación de la relación existente entre la desviación estándar y la concentración de vitamina C..... | 22 |
| Cuadro VI. Valores obtenidos de una disolución de jugo de naranja BOR para la determinación de la repetitividad del instrumento..... | 24 |
| Cuadro VII. Determinación de la precisión método de análisis para la vitamina C..... | 24 |
| Cuadro VIII. Ambito lineal, ecuación de la recta de mejor ajuste de la curva de calibración y su respectivo coeficiente de correlación para la determinación de vitamina C..... | 25 |
| Cuadro IX. Límites de confianza para la pendiente: b y para la ordenada en el origen: a, para la vitamina C, a un nivel de confianza del 95 % obtenidos por el método de HPLC..... | 26 |
| Cuadro X. Comparación de los resultados para la determinación del límite de detección (LDD) y el de cuantificación (LDC)..... | 27 |
| Cuadro XI. Comparación de las concentraciones obtenidas por el método de HPLC propuesto y el método oficial volumétrico del 2,6-dicloroindofenol..... | 28 |
| Cuadro XII. Datos obtenidos para la determinación de la relación existente entre la desviación estándar y la concentración de glucosa..... | 33 |
| Cuadro XIII. Datos obtenidos para la determinación de la relación existente entre la desviación estándar y la concentración de fructosa..... | 33 |
| Cuadro XIV. Datos obtenidos para la determinación de la relación existente entre la desviación estándar y la concentración de sacarosa..... | 33 |

| | |
|---|----|
| Cuadro XV. Valores obtenidos experimentalmente de la prueba de Cochran para cada nivel de concentración para la glucosa, fructosa y sacarosa..... | 35 |
| Cuadro XVI. Valores obtenidos de una disolución de jugo de naranja BOR para la determinación de la repetitividad del instrumento..... | 35 |
| Cuadro XVII. Determinación de la precisión del método de análisis para la glucosa, fructosa y sacarosa..... | 36 |
| Cuadro XVIII. Ambito lineal, ecuación de la recta de mejor ajuste de la curva de calibración y su respectivo coeficiente de correlación para la glucosa, fructosa y sacarosa..... | 37 |
| Cuadro XIX. Valores de tr encontrados para las gráficas de linealidad para la glucosa, fructosa y sacarosa..... | 37 |
| Cuadro XX. Límites de confianza para la pendiente: b y para la ordenada en el origen: a, para la glucosa, fructosa y sacarosa a un nivel de confianza del 95 % obtenidos por el método de HPLC..... | 39 |
| Cuadro XXI. Comparación de los resultados para la obtención del límite de detección (LDD) y el de cuantificación (LDC)..... | 40 |
| Cuadro XXII. Determinación del porcentaje de recuperación para la muestra de jugo de naranja BOR enriquecida a un nivel de mediana concentración..... | 41 |
| Cuadro XXIII. Comparación de las concentraciones obtenidas por el método de HPLC propuesto y el método oficial volumétrico de Lane y Eynon..... | 41 |
| Cuadro XXIV. Comparación del contenido de azúcares totales, sólidos solubles y grados Brix obtenidos mediante HPLC y refractometría..... | 44 |
| Cuadro XXV. Contenido de sacarosa, glucosa y fructosa % (m/v) en los diversos jugos de naranja por la técnica de HPLC..... | 48 |
| Cuadro XXVI. Acidez total encontrada en los jugos de naranja indicada como porcentaje de ácido cítrico..... | 49 |
| Cuadro XXVII. Relación entre contenido de sólidos solubles en grados Brix, y acidez titulable, como ácido cítrico anhidro..... | 54 |
| Cuadro XXVIII. Contenido de sólidos totales, sólidos solubles y sólidos insolubles % (m/m) obtenidos para los jugos de naranja..... | 56 |
| Cuadro XXIX. Vitamina C obtenida para los diversos jugos de naranja..... | 57 |

| | |
|---|----|
| Cuadro XXX. Contenido de cenizas en % (m/m) en base seca, encontradas para los diferentes jugos de naranja..... | 59 |
| Cuadro XXXI. Constantes físicas y químicas obtenidas para los jugos de naranja analizados.. | 61 |
| Cuadro XXXII. Colorantes encontrados en los jugos de naranja analizados y su respectivo Rf..... | 64 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Mecanismo de la clarificación y de gelificación de los jugos..... | 4 |
| Figura 2. Degradación del ácido ascórbico..... | 4 |
| Figura 3. Reacción de oxidación y reducción del ácido ascórbico con 2,6- dicloroindofenol..... | 9 |
| Figura 4. Estructura de una reductona..... | 9 |
| Figura 5. Espectro de absorción ultravioleta para la determinación de ácido ascórbico en disolución de fase móvil con EDTA al 0.05 %..... | 18 |
| Figura 6. Cromatograma HPLC para la disolución estándar de vitamina C; 100 mg/L, a un flujo de 0.7 mL/min..... | 19 |
| Figura 7. Cromatograma HPLC para la disolución de ácido ascórbico a 100 mg/L para prueba de estabilidad..... | 20 |
| Figura 8. Cromatograma HPLC para una muestra de jugo de naranja BOR, a un flujo de 0.7 mL/min..... | 21 |
| Figura 9. Variación de la desviación estándar de los valores de área con respecto a la concentración de vitamina C..... | 22 |
| Figura 10. Evaluación de la linealidad y del ámbito lineal para el análisis de la vitamina C por HPLC..... | 26 |
| Figura 11. Cromatograma HPLC para una disolución estándar de glucosa, fructosa y sacarosa..... | 31 |
| Figura 12. Cromatograma HPLC para una muestra de jugo de naranja BOR..... | 31 |
| Figura 13. Variación de la desviación estándar de los valores de área con respecto a la concentración de glucosa..... | 34 |
| Figura 14. Variación de la desviación estándar de los valores de área con respecto a la concentración de fructosa..... | 34 |
| Figura 15. Variación de la desviación estándar de los valores de área con respecto a la concentración de sacarosa..... | 34 |

| | |
|---|----|
| Figura 16. Evaluación de la linealidad y del ámbito lineal para el análisis de la glucosa por HPLC..... | 37 |
| Figura 17. Evaluación de la linealidad y del ámbito lineal para el análisis de la fructosa por HPLC..... | 37 |
| Figura 18. Evaluación de la linealidad y del ámbito lineal para el análisis de la sacarosa por HPLC..... | 37 |
| Figura 19. Curva de calibración de porcentaje de sacarosa contra índice de refracción y grados Brix..... | 43 |
| Figura 20. Diagrama del porcentaje de grados Brix (encontrados mediante refractometría) en los jugos de naranja..... | 45 |
| Figura 21. Diagrama de la concentración de azúcares totales (encontrados mediante el método de HPLC) en los jugos de naranja..... | 45 |
| Figura 22. Diagrama de la concentración de azúcares en sus componentes individuales; glucosa, fructosa y sacarosa..... | 47 |
| Figura 23. Diagrama de acidez titulable encontrada para los diferentes jugos de naranja...52 | |
| Figura 24. Diagrama de los valores de pH para los diferentes jugos de naranja..... | 52 |
| Figura 25. Diagrama de la relación entre el contenido de sólidos solubles en °Brix y acidez titulable..... | 53 |
| Figura 26. Diagrama del porcentaje de sólidos totales encontrados en los diferentes jugos de naranja..... | 55 |
| Figura 27. Diagrama de la concentración de vitamina C (encontrada mediante el método de HPLC) en los jugos de naranja..... | 58 |
| Figura 28. Diagrama del porcentaje de ceniza en base seca encontrado para los diferentes jugos de naranja..... | 60 |
| Figura 29. Diagrama de los valores de densidad para las muestras de jugo de naranja analizadas..... | 60 |
| Figura 30. Cromatograma en papel Whatman N°1 obtenido para seis muestras de jugo de naranja junto con el estándar..... | 63 |

1. INTRODUCCIÓN

1.1 GENERALIDADES

La naranja, un cítrico propio de zonas tropicales, es una de las frutas más comunes de Costa Rica; quizá por las excelentes condiciones climáticas que ofrece nuestro territorio para que se lleve a cabo la cosecha. Hasta la fecha, existen aproximadamente 3500 Ha cultivadas con esta fruta ¹. Actualmente la zona más rica en este cultivo es la Zona Norte, específicamente en San Carlos y Sarapiquí, siendo esta última, el lugar que presenta la mayor proporción de tierra sembrada con árboles de naranja. Otras zonas en las cuales se cultiva el cítrico son en Grecia y en Los Chiles.

La naranja después del limón, es la fruta de mayor contenido de vitamina C y vitamina A, además de contener diversas clases de sales minerales, tales como: sales de calcio, de potasio, de magnesio así como de hierro, fósforo, azufre y yodo ².

Las especies más importantes de las naranjas son:

- a. Las naranjas dulces (*Citrus sinensis*), en sus variedades, Valencia Late, el grupo de las Navel, Shamouti y otras muchas.
- b. Las naranjas amargas (*Citrus aurantium*), que se utilizan, principalmente, para la fabricación de jaleas y mermeladas.

Las partes del fruto de la naranja ³ son las siguientes:

1. El flavedo, es el tejido exterior que está en contacto con la epidermis y en él abundan vesículas, que contienen lípidos, aceites esenciales y cromoplastos.
2. Debajo del flavedo está el albedo que es un tejido esponjoso, blanco y celulósico y constituye la mayor parte de la corteza. El mismo tejido forma el corazón del fruto y ambos contienen los vasos que proporcionan al fruto el agua y los materiales nutritivos.
3. El endocarpio es la parte comestible de los cítricos y está formado por los carpelos o gajos que están compuestos por vesículas que contienen el jugo y están separados por las membranas intercapelares. El jugo contiene los componentes solubles y partículas en suspensión tales como pigmentos, pectinas, tejidos desintegrados, etc. La pulpa y el bagazo, que quedan al extraer el jugo contiene la parte fibrosa y celulósica.
4. La semillas de cubierta dura ligninocelulósica, están formadas en gran parte de grasas.

Los productos industriales más importantes derivados de las naranjas son: el jugo natural, el jugo concentrado y el jugo concentrado congelado.

1.2 DEFINICIÓN DE JUGO

Como jugo de naranja, se define al líquido obtenido del proceso de exprimir naranjas, no diluido, el cual puede ser sometido a un tratamiento adecuado que asegure su conservación en envases herméticos⁴.

El jugo de naranja se acostumbra ofrecer al público para su consumo directo, en diversas formas y presentaciones⁵, entre las que merecen citarse las siguientes:

1. Jugo de naranja recién exprimido, 100% natural. Se almacena en botellas plásticas y se conserva a bajas temperaturas para su posterior comercialización.
2. Jugo de naranja tratado térmicamente, ya sea por el proceso UHT o pasteurizado.
3. Jugo de naranja conservado por medios químicos. Se almacena en botellas plásticas o en envases herméticos.

1.3 COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL JUGO DE NARANJA.

Uno de los factores primarios de la calidad en los jugos de naranja; es el contenido de sólidos disueltos, que varía según el tipo de naranja, el grado de madurez y las técnicas de cultivo. Los sólidos solubles del jugo de naranja lo constituyen fundamentalmente: los azúcares reductores y no reductores y los ácidos³. Los principales azúcares en los jugos 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.

Los ácidos orgánicos son componentes importantes de los sólidos solubles en el jugo de naranja. El ácido cítrico es el más característico y predominante, en segundo lugar se encuentra el ácido málico y otros en pequeñas proporciones. La acidez de los jugos cambia, según la variedad, la zona de cultivo y el grado de maduración. Durante el desarrollo de las naranjas la cantidad de ácidos libres aumenta en los frutos al comenzar el crecimiento y luego permanece casi constante, pero disminuyen por dilución, cuando el fruto aumenta de tamaño. En la maduración, el contenido de ácido cítrico disminuye notablemente. El pH del jugo aumenta a medida que el fruto madura; sin embargo, por el efecto de la disolución amortiguadora entre el ácido cítrico y el citrato, las variaciones de ácidos libres sólo dan lugar a cambios relativamente pequeños en el pH (de 2.5-a 3.8 aproximadamente). Los ácidos están en forma libre o como sales inorgánicas. En las naranjas, el 80% del ácido cítrico está en forma de ácido y el resto, en su mayor parte, como citrato ácido de potasio, ya que este es el más abundante de los cationes en los jugos de naranja. Otros de los ácidos que se encuentran en el jugo de naranja se muestran en el cuadro I.

Cuadro I. Acidos libres y combinados en el jugo de naranja³.

| Componente | Ambito |
|---|-----------|
| pH | 2.9-3.8 |
| Acido cítrico y citratos (mg/mL) | 8.30-25.5 |
| Acido málico y malatos (mg/mL) | 1.0-1.8 |
| Sales totales (expresada en mg de cítrico/mL) | 2.5-3.4 |
| Acidos libres (% m/m respecto a ácidos + sales) | 7.0-9.0 |

La calidad de la naranja para la fabricación de jugo se mide sobre todo, por el contenido de jugo, los sólidos solubles y el índice de maduración. Como índice de maduración se conoce a la relación de °Brix/acidez expresada como ácido cítrico; se recomienda que este valor no debe ser menor de 5.5-6.0. Por otro lado el grado de acidez deseable para la fabricación de jugo es del 1%, pero puede oscilar entre 0.7 al 1.6 %, según el contenido de azúcares. Un jugo con una acidez menor del 0.7 % puede resultar insípido y poco agradable, a pesar de tener una relación alta de azúcares/acidez (Índice de Maduración). Resulta ventajoso para la calidad, dejar la fruta en el árbol el mayor tiempo posible, para permitir el desarrollo completo del aroma, de la proporción de sólidos disueltos y del índice de maduración, asegurando la desaparición de sabores amargos.

En el jugo de naranja las enzimas más importantes son la pectinmetil esterasa y la ácido ascórbico oxidasa. La acción de estas enzimas en la calidad del jugo, influye decisivamente en sus propiedades. Por ejemplo, la pectinmetil esterasa produce la sedimentación de la pulpa en suspensión, desapareciendo la turbiedad o nube y dejando un líquido transparente, que hace perder al jugo todo su valor comercial. La pectinmetil esterasa actúa sobre las pectinas disueltas y sobre las partículas de pulpa en suspensión, produciendo grupos -COOH libres, de ácidos pectínicos. Estos forman sales insolubles, con los iones Ca^{+2} existentes en el jugo, aglomerando las partículas en una red tridimensional, esto se traduce, en el jugo natural, en la aparición de la pulpa fina y clarificación (Figura 1). La clarificación puede evitarse, impidiendo la acción de la pectinmetil esterasa o la formación posterior de sales cálcicas; por ejemplo la pectinmetil esterasa se puede inactivar mediante la pasteurización del jugo.

1.4 PASTEURIZACIÓN DEL JUGO DE NARANJA.

En la fabricación industrial, la pasteurización es una de las operaciones clave y debe realizarse, con la menor duración posible. Se recurre a un calentamiento térmico rápido, utilizando intercambiadores de calor tubulares o de placas, para asegurar la destrucción de la pectinmetil esterasa. Este tratamiento es adecuado para productos cítricos, porque interesa inactivar las enzimas, pero evitando en lo posible, la aparición de sabores a cocido en el jugo. Esto ocurre si las condiciones tiempo - temperatura utilizadas son más enérgicas de lo estrictamente necesario para lograr la simple inactivación enzimática (cuadro II).

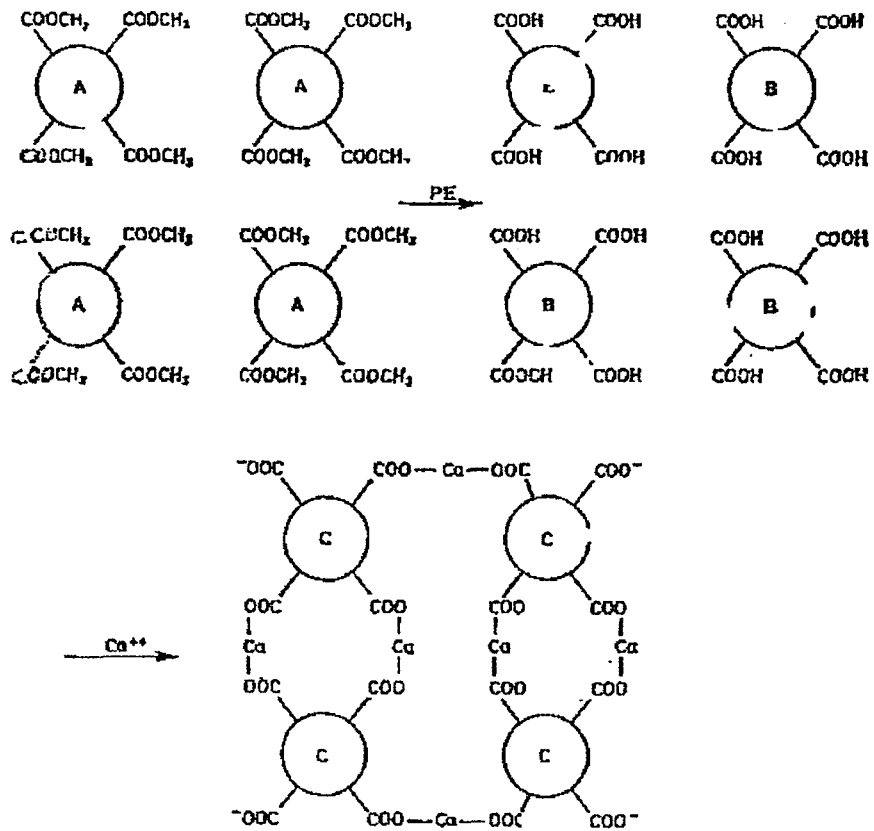


Figura 1. Mecanismo de la clarificación y de gelificación de los jugos

Cuadro II. Condiciones de pasteurización para la inactivación de la pectinmetil esterasa (P.E) en jugos de naranja³.

| Temperatura (°C) | pH=3.5 | | | pH=4 | | |
|------------------|------------------|------|------|------------------|------|------|
| | Tiempo (s) | | | Tiempo (s) | | |
| | 3 | 6 | 12 | 3 | 6 | 12 |
| | Inactivación (%) | | | Inactivación (%) | | |
| 85 | 93.5 | 95.0 | 98.0 | 90.0 | 92.5 | 96.0 |
| 90 | 98.5 | 100 | 100 | 94.5 | 96.0 | 98.5 |
| 95 | 100 | 100 | 100 | 98.0 | 99.0 | 99.5 |
| 99 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |

1.5 LA VITAMINA C EN EL JUGO DE NARANJA.

La vitamina C, llamada también ácido ascórbico, se presenta en forma de pequeñas láminas incoloras de sabor ácido, muy solubles en agua y relativamente solubles en alcohol⁶. En los productos naturales se halla preferentemente en jugos de frutas y dentro de éstos, alcanza sus más elevadas proporciones en los procedentes de las frutas cítricas y grosella negra. Los agentes antioxidantes transforman el ácido ascórbico (Figura 2) en ácido dehidroascórbico y de este a ácido dicetogulónico, hasta culminar con polímeros pardos melanoides³.

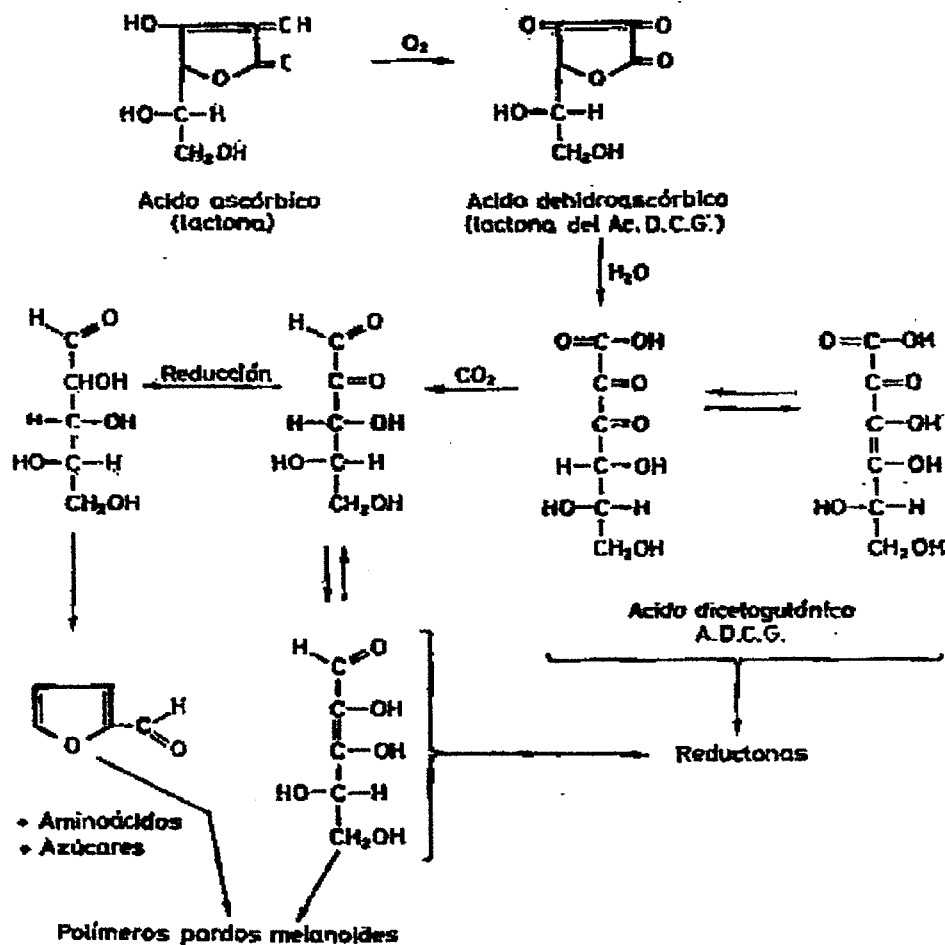


Figura 2. Degradación del ácido ascórbico.

Desde el punto de vista de la nutrición, la vitamina C tiene propiedades antiescorbúticas y su deficiencia en los organismos animales conduce a la aparición de hemorragias, encías inflamadas y sangrantes, cambios de estructura de la dentina, fragilidad de los huesos, mala cicatrización de las heridas, etc ⁶. Las principales ventajas que se pueden conseguir al enriquecer una bebida refrescante a base de jugo de naranja con vitamina C, pueden ser de índole nutritiva o de orden técnico. Si se tiene en cuenta que la dosis diaria de ácido ascórbico que necesita el organismo humano varía de 40 a 80 mg, bastaría consumir una botella de 250 mL de jugo de naranja que contenga una concentración de vitamina C de 25 mg/100 mL para suplir esta dosis. Las ventajas de orden técnico que lleva consigo la presencia mínima de vitamina C se basan en el carácter reductor de este compuesto, debido a ello se pueden evitar o aminorar sensiblemente las alteraciones que dichas bebidas experimentan durante su almacenamiento tales como alteraciones en el color alteraciones en el sabor y alteraciones en el aroma.

Se comporta como un agente reductor, derivándose de ésta propiedad un buen número de sus aplicaciones prácticas en la industria de alimentos, especialmente en aquellos casos en que determinadas acciones oxidantes puedan conducir a alteraciones desfavorables en dichos productos durante su conservación ⁶. En estado cristalizado, el ácido ascórbico es perfectamente estable, sin embargo en disolución acuosa es inestable en presencia del oxígeno del aire, acelerándose su destrucción por la temperatura y por la presencia de iones férricos y cúpricos así como por la enzima llamada ácido ascórbico oxidasa. Su estabilidad en disoluciones está también relacionada con el pH, siendo mayor aquella cuanto más bajo es este último.

El jugo de naranja se ha llegado a constituir en una bebida de consumo diario, así lo indicó la revista de Mercadeo Alimentario ⁷, que destacó que dicho jugo ocupa la tercera posición en cuanto a frecuencia de consumo de las bebidas más populares en los hogares costarricenses siendo superada solamente por las bebidas gaseosas y los siropes.

Los jugos de naranja del tipo 1 (100 % natural) son vendidos en los supermercados Mas X Menos, Muñoz y Nanne y Automercados. Dentro de las principales empresas nacionales que se encargan de la elaboración de jugos de naranja procesados de los tipos (2, 3 y 4) están la Cooperativa de Productores de Leche R, L (Dos Pinos), Borden, Coopecoronado, La Finca. Sin embargo existen otras empresas transnacionales tales como, Hi-C, Del Valle, que también producen concentrados de naranja diluídos y son vendidos en Costa Rica.

1.6 CONTROL DE CALIDAD.

Un aspecto muy importante es el control de calidad del producto desde su manufactura hasta su venta en el mercado. El consumidor de las bebidas espera siempre obtener un producto absolutamente puro así como un gusto igual día tras día, semana tras semana. A fin de conservar la uniformidad y calidad de sus productos, es esencial que la industria controle ciertos parámetros de calidad de una manera responsable, estos parámetros son: sólidos solubles o grados Brix, pH, acidez titulable, sólidos totales, azúcares totales (reductores y no reductores), vitamina C, densidad, así como el control bacteriológico de levaduras y mohos, pues son los que le dan al jugo el sabor no deseado.

El control de calidad y el control de procesos se basa en normas que pueden ser estatales, contractuales o de la empresa misma. El laboratorio de control de calidad debe realizar análisis tanto de materias primas, productos sin terminar y productos acabados asumiendo un rol de suma importancia en el desarrollo de una empresa.

1.7 METODOLOGÍA ANALÍTICA RECOMENDADA PARA EL ANÁLISIS DE JUGOS DE NARANJA.

1.7.1 Sólidos totales

Para averiguar el contenido de sólidos totales existen varios métodos para llevar a cabo dicha determinación, dentro de los cuales se pueden citar los métodos FAO/OMS del Codex Alimentarius para análisis de azúcares ⁸ y los métodos ICUMSA de análisis de azúcar ⁹; sin embargo, estos no son específicos para jugo de naranja pero brindan información en cuanto a los cuidados que hay que tomar con la muestra. Dentro de las normas ICAITI para productos elaborados a partir de frutas y hortalizas, ¹⁰ hay un método para la determinación de sólidos totales específicamente para jugos de frutas.

1.7.2 Determinación de cenizas

La ceniza es el residuo inorgánico que permanece después de la combustión o incineración de la materia orgánica. La cantidad es un parámetro de gran importancia para evaluar la calidad y grado de adulteración de un producto. El método oficial para la determinación de cenizas en el jugo de naranja es del AOAC 940.26 ¹¹. También está el de la norma ICAITI 34 00 ¹².

1.7.3 Sólidos solubles

Para determinar los sólidos solubles, se han propuesto métodos oficiales para jugos de frutas. Tanto en el AOAC ¹¹ como en las normas del Codex Alimentarius ¹³ e ICAITI ¹⁴ la determinación se realiza con un refractómetro de Abbé, en el que se determina el índice de refracción y por medio de tablas o con curva de calibración se determina la concentración de sólidos solubles en el jugo, y se expresa en grados Brix. Un ° Brix es la densidad que tiene a 20°C una disolución de sacarosa al 1% y a esta densidad corresponde

también un determinado índice de refracción ³. Los refractómetros comerciales, para este objeto, están graduados en una escala de ° Brix, aunque suelen también llevar otra escala en índice de refracción.

1.7.4 pH y acidez titulable

Para determinar el pH, el método oficial del AOAC ¹¹ para jugos de frutas, así como la Norma ICAITI ¹⁵, es mediante la diferencia de potencial entre dos electrodos sumergidos en la muestra, en donde uno de ellos es un electrodo de vidrio y el otro un electrodo de referencia de plata/cloruro de plata, ambos conectados a un pHmetro calibrado. Para la determinación de la acidez total se pueden aplicar el método oficial de la AOAC ¹¹, así como la norma del Codex Alimentarius ¹³ o la norma ICAITI ¹⁵. Los tres métodos consisten en una titulación volumétrica con una disolución valorada de NaOH 0.1000 mol/L y el resultado se expresa en g de ácido cítrico/100 mL de jugo.

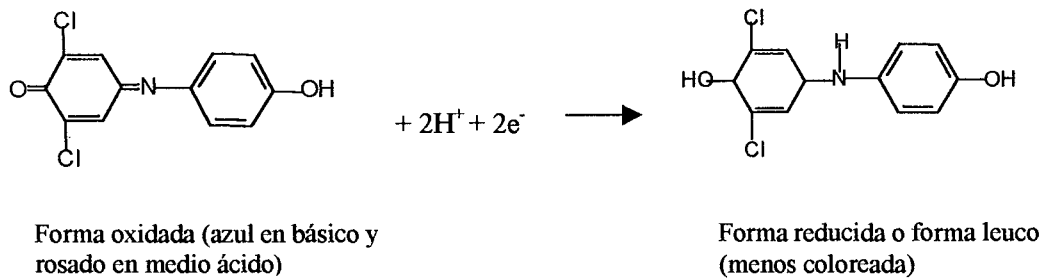
1.7.5 Determinación de los azúcares reductores y no reductores.

Existen varios métodos para la determinación de los azúcares reductores y no reductores en el jugo. En el Journal of Food Science ¹⁶, la determinación de los azúcares solubles en el jugo de naranja se realiza por el método colorimétrico de antrona de Farbain (1953), en el Codex Alimentarius se determinan según el método de Luft-Schoorl y los resultados se expresan en % m/m, sin embargo estos dos métodos solamente determinan azúcares totales.

Uno de los métodos oficiales es el método volumétrico de Lane y Eynon, recomendado por ICUMSA y varios autores ^{9, 17}. Este método depende de la propiedad poseída por la glucosa y fructosa y otros azúcares reductores en disoluciones alcalinas de reducir el Cu^{+2} a Cu^{+1} , la cantidad de cobre que se reduce está en proporción a la cantidad de azúcares reductores presentes. Sin embargo por medio de la cromatografía líquida de alta resolución, se pueden determinar la concentración en forma independiente de cada uno de estos tres azúcares. Este método ha demostrado tener gran precisión y mayor rapidez en el análisis, pues se da la eliminación de pasos adicionales en la preparación de la muestra ^{18,19}.

1.7.6 Determinación de vitamina C

El método oficial para la determinación de vitamina C en el jugo de naranja es el recomendado por el AOAC ¹¹, que se basa en la reducción del 2,6-dicloroindofenol. El 2,6-dicloroindofenol es reducido por el ácido ascórbico a la forma menos coloreada como se muestra en la Figura 3.



y el ácido ascórbico se oxida a ácido dehidroascórbico.

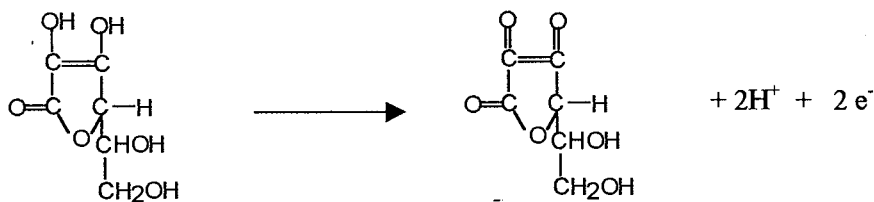


Figura 3. Reacción de oxidación y reducción del ácido ascórbico con 2,6-dicloroindofenol

Sin embargo este método presenta varias desventajas entre las cuales están:

- a. Presencia de otras sustancias que pueden reducir el 2,6-dicloroindofenol, tales como fenoles, tiosulfatos, iones férricos y cúpricos así como las reductonas, (Figura 4) las cuales actúan como agentes reductores muy potentes²⁰.

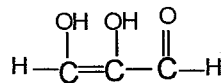


Figura 4. Estructura de una reductona

- b. También se da la interferencia del color de muestras coloreadas en la determinación del punto final.

Debido a estas razones se han propuesto varios métodos de cromatografía líquida empleando para esto diferentes tipos de columnas y fases móviles. Esta técnica combina alta selectividad y sensibilidad así como rapidez, ya que provee un método de análisis para el ácido ascórbico en una gran variedad de bebidas, además de poderlo separar de una serie de interferencias potenciales, ya que absorbe fuertemente en la región ultravioleta, no así otros constituyentes del jugo. El ácido ascórbico es también separado del ácido dehidroascórbico, pero este último no absorbe fuertemente en esta misma región, para ser cuantificado.²¹

1.7.7 Determinación cualitativa de colorantes

La determinación de colorantes en alimentos se puede realizar cualitativamente y cuantitativamente. El método oficial según la Organización Panamericana de la Salud, (OPS)²³, consiste en un tratamiento preliminar de la muestra seguida de la extracción e identificación de los colorantes. La identificación se realiza mediante cromatografía de papel Whatman N° 1 empleando como fase móvil una disolución de amoníaco concentrado, citrato de sodio y agua. Esta determinación es cualitativa.

1.8 NORMAS EXISTENTES.

Existen una serie de normas internacionales, tales como las del Instituto Centro Americano de Investigación y Tecnología Industrial, (ICAITI) que tienen normas para bebidas no carbonatadas ICAITI 34 215:93²⁴ y una específica para jugo de naranja ICAITI 34008²⁵; por otro lado están las normas del Codex Alimentarius^{26, 27} que se han creado específicamente para jugo de naranja. Los parámetros más importantes que destaca la norma ICAITI 34008,²⁵ se expresan en el cuadro III.

El Instituto de Normas Técnicas de Costa Rica (INTECO) que es un organismo privado, multisectorial, independiente y sin fines de lucro que brinda apoyo especializado en información, normalización y certificación, ha hecho intentos por desarrollar proyectos de normalización para jugos de frutas y para bebidas no carbonatadas, pero dichos proyectos aún no han sido aprobados por no cumplir con los requisitos necesarios para poder ser aceptados como una norma. Tal es el caso de los proyectos: “Norma para los refrescos no carbonatados” INTE, 02-04-01-97²⁴ y “Norma general para el jugo de frutas” INTE, 02-02-06-97²⁵.

Debido a estas razones y a que el país no cuenta con normas aprobadas para este tipo de bebidas, resulta de esencial importancia contar con un perfil de calidad que pueda ser la base para una norma general para jugos de naranja. Para el desarrollo de dicha norma se tomará como parámetro de comparación las normas internacionales antes mencionadas.

Cuadro III. Parámetros físicos y químicos en el jugo de naranja, según la norma ICAITI 34008.

| Características físicas y químicas | Calidad A | | Calidad B | |
|---|-----------|--------|-----------|--------|
| | Máximo | Mínimo | Máximo | Mínimo |
| Densidad relativa a 20 °C | - | 1.040 | - | 1.040 |
| Acidez titulable: | | | | |
| a) expresada en ácido cítrico anhidro, en g/100 mL | 1.40 | 0.75 | 1.70 | 0.65 |
| b) Expresada en meq/L | 218.75 | 117.19 | 327.92 | 101.50 |
| Sólidos solubles por lectura refractométrica a 20°C, (°Brix) | - | 10 | - | 10 |
| Relación entre el contenido de sólidos solubles en °Brix, y acidez titulable, como ácido cítrico anhidro. | 18 | 7 | 18 | 6 |
| Sólidos en suspensión, en porcentaje (V/V) | 10 | - | 10 | - |
| Acido ascórbico, en ppm | - | 350 | - | 300 |
| Contenido en aceite esencial, mL/L | 0.4 | - | 0.5 | - |
| Contenido de plomo (Pb), en ppm | 2.0 | - | 2.0 | - |
| Contenido de arsénico (As), en ppm | 0.1 | - | 0.1 | - |
| Contenido de cobre (Cu), en ppm | 10.0 | - | 10.0 | - |

2.0 MATERIALES Y MÉTODOS.

2.1 MUESTREO Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA.

La toma de las muestras fue realizada por inspectores de la Oficina Nacional de Normas y Unidades de Medidas (O.N.N.U.M.). Se aplicó el modelo de “muestreo preliminar”, que consiste en una visita a los principales supermercados y en el decomiso de cinco “muestras” de cada una de las marcas encontradas de jugo de naranja.^{30, 31, 32}

El muestreo se concentró en las empresas productoras nacionales que abarcan el mercado nacional, además se mostró una empresa transnacional (VA). La cantidad e identidad de las marcas analizadas dependió estrictamente de la disponibilidad del producto en los supermercados, al momento de la visita de los inspectores. En total se decomisaron 15 muestras de jugo de naranja, tres corresponden a jugos naturales (AU, HO y MN), ocho a jugos pasteurizados (SF, OJ, JND, NDC, BO, BCV, JB, VA) y cuatro a refrescos de naranja (RND, LF, CN y RDB)

Tras el decomiso, los jugos de naranja fueron transportados al laboratorio en bolsas plásticas, debidamente selladas por funcionarios de la ONNUM. La muestra compuesta se obtuvo al mezclar los cinco jugos de naranja de la misma marca y presentación de la cual se tomó una cantidad representativa que fue guardada en una botella bien cerrada y etiquetada con un código compuesto de dos y tres letras, posteriormente se almacenaron en un congelador a -10 °C para su posterior análisis.

2.2 EQUIPO Y METODOLOGÍA UTILIZADA.

Para la determinación de los sólidos totales se siguió el método oficial de la norma ICAITI 34 003 h9¹⁰, para esto se utilizó una estufa de precisión Scientific Inc, modelo ST 640 placa 9861, a una temperatura de 60 °C. Para la determinación de cenizas se siguió el método oficial recomendado por AOAC 940.26¹¹ y el de la norma ICAITI 34 003 h 30¹², para esto se utilizó una mufla marca Thermolyne Type 30400 Furnace placa 9102 a una temperatura de 525 °C. Para los sólidos solubles se siguió el método oficial de la norma ICAITI 34 003 h10,¹¹ con la única modificación de que se hizo una curva de calibración, el procedimiento se llevó a cabo utilizando un refractómetro de Abbé marca Miton Roy Company, placa 957. Para la determinación del pH y la acidez total, se siguieron los métodos oficiales del AOAC¹¹ y el de la norma ICAITI,¹⁵ utilizando una disolución de NaOH con una concentración de 0.1370 ± 0.0003 mol/L y un pHmetro HANNA instrumentos HI 9017 placa 138385 con electrodo integrado de vidrio-calomel. Para la determinación de la densidad se siguió el método oficial de la norma ICAITI 34 003 h5,²² para esto se utilizó un densímetro electrónico marca AP PARA modelo DMA 48; por último la determinación de los colorantes se realizó por el método de la OPS.²³

2.3 DETERMINACIÓN DE ÁCIDO ASCÓRBICO (VITAMINA C).

2.3.1 Preparación de las muestras.

Cada muestra de jugo de naranja se filtró a través de algodón, a un vial de 50 mL de capacidad, a partir de esta disolución se tomó una alícuota de 5.00 mL y se colocó en un balón de 25.00 mL y se aforó con una disolución de KH_2PO_4 0.1 M a un pH 2.14 regulado con H_3PO_4 y con EDTA al 0.05 %. Posteriormente se filtraron a través de un filtro de membrana de metilcelulosa de 0.45 μm antes de inyectarse al cromatógrafo. Para la determinación de este mismo compuesto por el método volumétrico del 2,6-dicloroindofenol se tomó una alícuota de 25.00 mL del jugo filtrado y se colocó en un balón de 100.00 mL aforándose con una disolución estabilizadora compuesta de ácido metafosfórico (15.0 g) en una mezcla de ácido acético glacial y agua (40 mL y 460 mL) respectivamente

2.3.2 Preparación de los patrones.

Para el análisis de vitamina C por HPLC se preparó una disolución madre de 1000 mg/L a partir del reactivo de ácido ascórbico calidad USP, la cual se protegió de la luz y se puso en refrigeración. A partir de esta disolución madre se prepararon las disoluciones de trabajo. Estas disoluciones se prepararon el mismo día en que se llevaba a cabo el análisis. Para esta misma determinación por el método del 2,6-dicloroindofenol se preparó una disolución de 2,6 -dicloroindofenol calidad p.a marca Merck. Luego se procedió a valorar con una disolución patrón de vitamina C y finalmente se protegió de la luz y se conservó en refrigeración.

2.3.3 Equipo y condiciones cromatográficas.

Se utilizó un cromatógrafo líquido de alta eficiencia con detector UV-Vis marca Varian modelo 9050, con suministrador de solvente de la misma marca y modelo 9012. Columna C18 de dimensiones 4.0 * 150 mm y tamaño de partícula de 0.45 μm . Se utilizó como fase móvil una disolución de KH_2PO_4 0.1 M a un pH 2.14 regulado con H_3PO_4 la cual fue filtrada con un sistema Milli Pore con membrana de 0.45 μm . El flujo fue de 0.7 mL/min y el volumen de inyección de la muestra y los patrones fue de 10 μL

2.3.4 Determinación de las figuras de mérito para vitamina C.

2.3.4.1 Determinación del ámbito lineal

Se pesó exactamente 0.2 g de ácido ascórbico y se disolvió con una disolución de KH_2PO_4 0.1 M a un pH 2.14 regulado con H_3PO_4 y con EDTA al 0.05 %, llevándose a un volumen final de 200.00 mL. De esta disolución se tomaron alícuotas de 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 5.0, 6.5 y 7.5 mL y se colocaron en balones de 50.00 mL para obtener concentraciones de 10.0, 20.0, 40.0, 60.0, 100.0 y 130.0 mg/L respectivamente.

2.3.4.2 Veracidad del método

Para evaluar la veracidad del método se enriquecieron muestras de jugo de naranja a un nivel intermedio de concentración del ámbito de trabajo de la vitamina C. En este caso el nivel de concentración fue de 20.0 mg/L.

2.3.4.3 Precisión

Se analizaron siete réplicas independientes de una muestra de jugo de naranja, utilizando el método de HPLC, bajo condiciones idénticas y en un mismo día, obteniéndose la desviación estándar en los resultados como medida de la repetitividad del análisis. Para la vitamina C se tomó una alícuota de 5.00 mL del jugo de naranja y se colocó en un balón aforado de 25.00 mL aforándose con la disolución de fase móvil y EDTA al 0.05.

2.3.4.4 Exactitud

La exactitud del método se obtuvo comparando los resultados obtenidos del análisis para la misma muestra de jugo de naranja por el método propuesto de HPLC con el método volumétrico oficial del 2,6-dicloroindofenol.

2.3.4.5 Límites de detección y de cuantificación.

Los límites de detección y de cuantificación fueron obtenidos para la vitamina C, mediante los métodos de Hubaux³³, Mayer y Zund³⁴ y el de Miller y Miller.³⁵

2.3.4.6 Ambito de trabajo.

Se prepararon tres disoluciones madres de vitamina C de concentración de 1000 mg/L. De cada disolución madre se prepararon siete patrones idénticos con cada una de las siguiente concentraciones: 20.0, 40.0 y 100.0 mg/L. Posteriormente se determinó el área de los 21 patrones y se graficó en función de la concentración ajustándose a una recta utilizando el método de mínimos cuadrados simples .

2.3.4.7 Sensibilidad

La sensibilidad se determinó como resultado de las curvas de calibración que se utilizaron en las cuantificaciones.

2.3.5 Cálculos

Se utilizó el programa de computación "Microsoft Excel 97" para hacer las figuras, hojas de cálculo y tratamiento estadístico.

2.4 DETERMINACIÓN DE AZÚCARES (SACAROSA, FRUCTOSA Y GLUCOSA) POR HPLC.

2.4.1 Preparación de las muestras.

Para la determinación de azúcares por HPLC, se tomó una alícuota de 2.00 mL del jugo filtrado y se colocó en un balón aforado de 50.00 mL y se aforó con agua desionizada. Posteriormente se filtró a través de un filtro de membrana de metilcelulosa de 0.45 μm antes de inyectarse al cromatógrafo. Para la determinación de azúcares reductores y no reductores por Lane y Eynon, se tomó una alícuota de 5.00 mL del jugo filtrado y se colocó en un balón aforado de 100.00 mL aforándose con agua destilada.

2.4.2 Preparación de los patrones.

Se prepararon disoluciones estándar de glucosa, fructosa y sacarosa al 2.000 % (m/v) y a partir de ellas se prepararon los diferentes patrones. Para esto se emplearon azúcares calidad p.a, de las casas fabricantes Merck y Mallinckrodt. Estos reactivos se desecaron por 2 horas a 60 °C en una estufa de vacío a una presión de 23 mm Hg. Posteriormente se guardaron en un desecador al vacío, con cloruro de calcio como desecante.

2.4.3 Equipo y condiciones cromatográficas

Se utilizó un cromatógrafo líquido de alta eficiencia con detector de índice de refracción modelo RIDGA, incluyendo horno, inyector automático modelo EZCHROM, bomba modelo LCGA e integrador, todo de la casa SHIMADZU. Columna Econosphaera NH₂ de dimensiones 250 mm *4.6 mm y tamaño de partícula de 5 μm . marca Alltech. Se usó el modelo isocrático que utiliza como fase móvil acetonitrilo:agua en proporción 80:20, filtrada por filtro de 0.45 μm Nylon y desgasificada en ultrasonido por 20 minutos. El flujo es de 2.0 ml/min y la temperatura de la columna es a temperatura ambiente. El volumen de inyección de la muestra y de los patrones fue de 20 μL El detector de índice de refracción se utilizó en un rango de 16E-6 RIU.

2.4.4 Determinación de las figuras de mérito para los tres azúcares.

2.4.4.1 Determinación del ámbito lineal

Se pesó exactamente 2.0000 g de glucosa, fructosa y sacarosa y se disolvieron con agua desionizada llevándose a un volumen final de 100.00 mL. A partir de esta disolución madre se tomaron alícuotas de 0.5, 1.0, 3.0, 5.0, 10.0, 15.0, 20.0 mL en balones aforados de 50.0 y 25.0 mL para obtener concentraciones de 0.02, 0.08, 0.24, 0.40, 0.60, 0.80, 1.2 y 1.6 % (m/v) respectivamente.

2.4.4.2 Veracidad del método

Se siguió el mismo proceso que en el punto 2.3.4.2 para vitamina C; en este caso el nivel de concentración intermedio fue de 0.2 % (m/v) para cada azúcar.

2.4.4.3 Precisión

Se siguió el mismo procedimiento del punto 2.3.4.3 para la vitamina C; en este caso se tomó una alícuota de 2.0 mL y se aforó con agua desionizada hasta un volumen de 50.00 mL.

2.4.4.4 Exactitud

La exactitud del método se obtuvo comparando los resultados obtenidos del análisis para la misma muestra de jugo de naranja por el método propuesto de HPLC con el método volumétrico oficial de Lane y Eynon.

2.4.4.5 Límites de detección y de cuantificación.

Los límites de detección y de cuantificación fueron obtenidos para los tres azúcares, mediante los métodos de Hubaux,³³ Mayer y Zund³⁴ y el de Miller y Miller.³⁵

2.4.4.6 Ambito de trabajo.

Se prepararon tres disoluciones madres de glucosa, fructosa y sacarosa de concentración de 2.000 % m/v para cada azúcar. A partir de cada una de ellas se prepararon siete patrones idénticos con cada una de las siguiente concentraciones: 0.0801, 0.402, 1.200 para la glucosa, 0.0804, 0.400 y 1.210 para la fructosa y 0.0802, 0.400 y 1.2011 para la sacarosa. Posteriormente se determinó el área de los 21 patrones para cada azúcar y se graficó en función de su respectiva concentración ajustándose a una recta utilizando el método de mínimos cuadrados simples .

2.4.4.7 Sensibilidad

La sensibilidad se determinó como resultado de las curvas de calibración que se utilizaron en las cuantificaciones.

2.4.5 Cálculos

Se utilizó el programa de computación "Microsoft Excel 97" para hacer las figuras, hojas de cálculo y tratamiento estadístico.

3. RESULTADOS CROMATOGRÁFICOS Y DISCUSIÓN.

3.1 VALIDACIÓN DEL MÉTODO

La validación de un método es el proceso mediante el cual se determina la conveniencia del método para proveer medidas útiles. Es necesaria la validación del método, con el fin de juzgar la utilidad de la metodología para proporcionar datos analíticos confiables y evitar decisiones subjetivas.³⁶

3.1.1 VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE VITAMINA C.

3.1.1.1 Estabilidad del ácido ascórbico.

Se ha comprobado³⁷ por diversos autores que una disolución de vitamina C en agua destilada a un pH igual a 7.00 es inestable, siendo rápidamente oxidada. Casi siempre esta velocidad de oxidación es reducida cuando el ácido ascórbico es preparado a pH bajos, y en disoluciones de alta concentración, es por este motivo que se escogió preparar disoluciones de vitamina C en disolución de fosfato diácido de sodio 0.2 M a un pH de 2.14, regulado con ácido fosfórico. Sin embargo diversos estudios,³⁷ han revelado que la altura del pico correspondiente al ácido ascórbico disminuye considerablemente al cabo de 80 minutos. Por esta razón, se pensó en agregar EDTA como agente estabilizante para incrementar la estabilidad del ácido ascórbico en las disoluciones patrón y en las muestras. El EDTA es un agente quelatante el cual reacciona con los iones metálicos en el sistema, que puede prevenir la oxidación del ácido ascórbico.³⁸ Este reactivo inhibe la oxidación catalítica del ácido ascórbico al reaccionar con iones metálicos tales como Cu^{+2} y Fe^{+3} . Según Lloyd y otros,³⁷ cuando se analizan disoluciones patrón de vitamina C con EDTA al 0.05 % cada 24 horas a temperatura ambiente, los resultados no presentan una disminución significativa del contenido de esta vitamina al cabo de 48 horas. Esto también se comprobó experimentalmente con la única modificación de que las disoluciones se guardaron en refrigeración.

Como se mencionó anteriormente el ácido ascórbico es muy inestable en disolución acuosa y ante la luz; por lo que una vez que se prepararon los patrones de este compuesto se protegieron de la luz con papel aluminio y se mantuvieron en refrigeración hasta el momento del análisis.

3.1.1.2 Comportamiento espectroscópico.

Se determinó el espectro de absorción ultravioleta de una disolución patrón de vitamina C con una disolución amortiguadora de fosfatos ($C_n = 0.2 \text{ mol/L}$) de pH 2.14, con EDTA al 0.05 % y empleando un blanco con los reactivos. El espectro se corrió en un ámbito de longitud de onda de 200 a 400 nm originándose un máximo a 244.0 nm como se observa en la Figura (5).

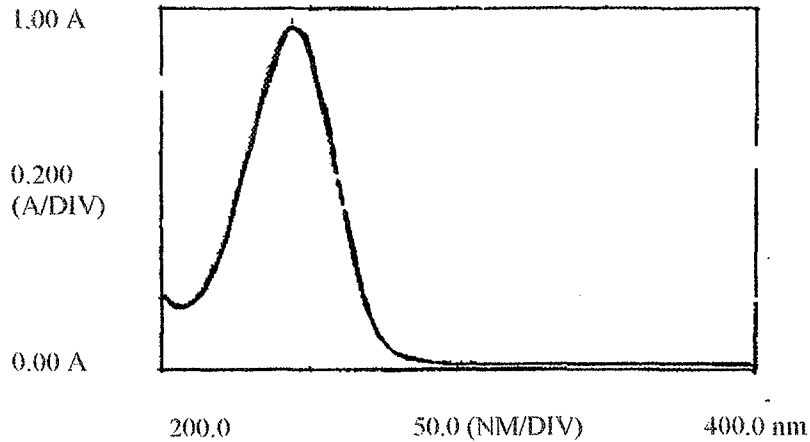


Figura 5. Espectro de absorción ultravioleta para la disolución de ácido ascórbico en disolución de fase móvil con EDTA al 0.05 %.

3.1.1.3 Optimización del método de ácido ascórbico (vitamina C).

Se procedió a realizar el análisis cromatográfico de vitamina C utilizando una columna C18 de dimensiones 4.0 * 150 mm y tamaño de partícula de 4.5 μm . Para dicho análisis se empleó una disolución patrón de 100.0 mg/L, empleando como fase móvil una disolución de KH_2PO_4 0.1 M a un pH 2.14, regulado con H_3PO_4 .

El estudio inició con la optimización de la velocidad de flujo una vez identificados los picos correspondientes al EDTA y al ácido ascórbico. Esto se llevó a cabo con el fin de obtener la mejor resolución de los picos; lo cual se hizo a 0.5, 0.6, 0.7 y 0.8 mL/min y por medio de la fórmula ³⁹

$$R = \frac{TR_2 - TR_1}{0.5 (\text{Ancho pico 2} - \text{Ancho pico 1}) * 1/60} \quad (1)$$

se obtuvieron los diferentes resultados de resolución.

Cuadro IV. Resolución de los picos de EDTA y vitamina C a los diferentes flujos de la fase móvil.

| Flujo (mL/min) | Resolución |
|-----------------|------------|
| 0.5 | 1.91 |
| 0.6 | 2.34 |
| 0.7 | 3.73 |
| 0.8 | 2.03 |

El flujo correspondiente a 0.7 mL/min presenta una mayor resolución de los picos y a la vez un tiempo de análisis relativamente corto por lo que se escogió para la determinación de vitamina C. En el apéndice A-1, se muestran los cromatogramas obtenidos a estos diferentes flujos.

La Figura 6 muestra el cromatograma obtenido para la disolución de 100.0 mg/L, a un flujo de 0.7 mL/min, en él se observan una serie de picos en el ámbito de (2.336- 2.972) min, correspondientes al EDTA y un pico a 3.828 min, correspondiente al ácido ascórbico; este último pico presenta un factor de asimetría de 1.0. Según Snyder y colaboradores,³⁸ ésta debe ser menor a 1.5, siendo uno para los picos exactamente simétricos.

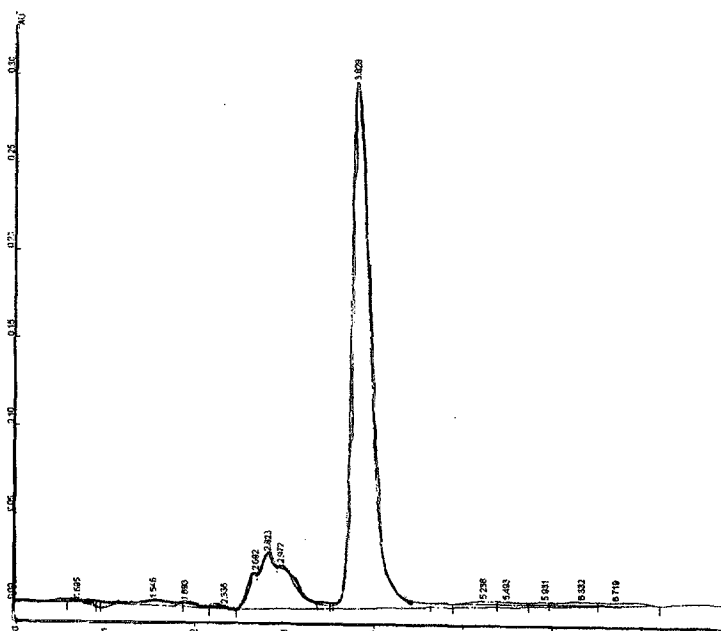


Figura 6. Cromatograma HPLC para la disolución estándar de vitamina C; 100 mg/L, a un flujo de 0.7 mL/min.

3.1.1.4 Estudio de estabilidad del ácido ascórbico

En la Figura (6) se observa el cromatograma obtenido para la disolución de 100.0 mg/L el cual presenta el pico de ácido ascórbico a un tiempo de retención de 3.828 min y un área en unidades de absorbancia de 2414863. Después de 72 horas, esta misma disolución se volvió a inyectar obteniéndose el cromatograma mostrado en la Figura (7); presentando el pico de ácido ascórbico a un tiempo de retención de 3.798 min y un área en unidades de absorbancia de 2305868, lo cual representa un 4.5 % de disminución del pico. Estos resultados demuestran que efectivamente el pH bajo, la concentración alta de KH_2PO_4 , la utilización de EDTA al 0.05 %, la protección de la luz y el almacenamiento en refrigeración, son condiciones adecuadas para la conservación del ácido ascórbico en disolución acuosa.

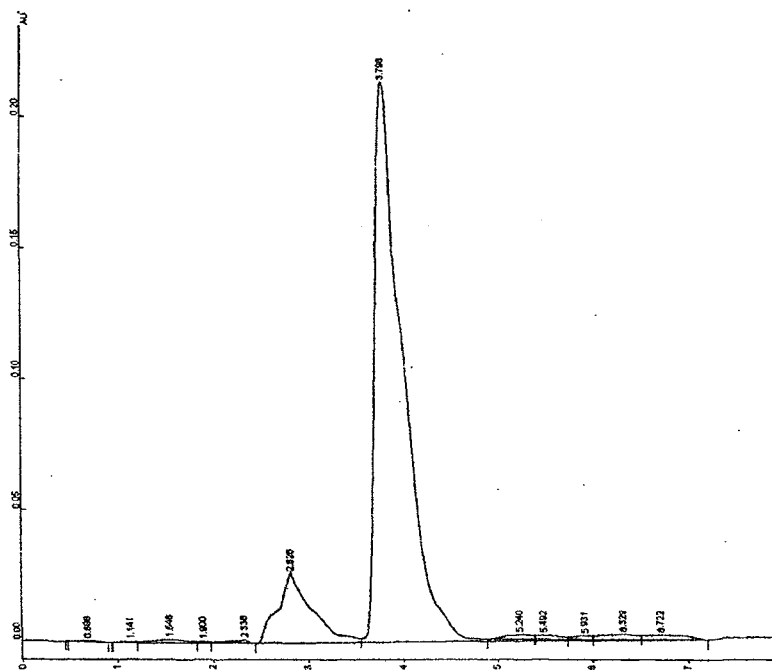


Figura 7. Cromatograma de HPLC para la disolución de ácido ascórbico a 100 mg/L para prueba de estabilidad.

3.1.1.5 Selectividad o especificidad del ácido ascórbico

Este concepto se refiere a la singularidad de respuesta de la metodología. Es muy difícil que un método responda solamente a un analito, por lo tanto es importante conocer y determinar el grado de interferencia de otras sustancias.⁴⁰ En las figuras 6 y 8 se compara la respuesta para la vitamina C en una disolución patrón con la respuesta de este mismo

analito en una muestra de jugo de naranja. Ambos picos salen a un tiempo de retención de 3.80 y de 3.82 min aproximadamente, además por lo que se concluye que existe singularidad en la respuesta del equipo.

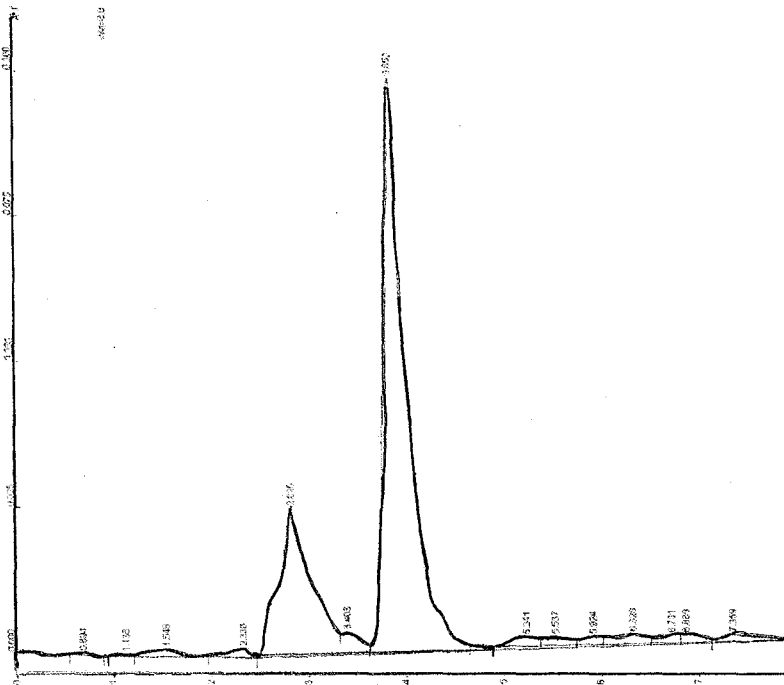


Figura 8. Cromatograma HPLC para una muestra de jugo de naranja BOR, a un flujo de 0.7 mL/min.

3.1.1.6 Precisión del método de ácido ascórbico.

La precisión se evaluó de tres formas diferentes. El primero de ellos se evaluó de acuerdo a lo estipulado por Taylor ⁴¹, el cual recomienda determinar primeramente la relación existente entre la desviación estándar de las áreas obtenidas de los picos cromatográficos contra la concentración correspondiente, luego por medio de la prueba estadística de Cochran ⁴² se puede comprobar si las desviaciones estándar difieren o no significativamente. Si estas desviaciones estándar no difieren significativamente se puede utilizar mínimos cuadrados simples de lo contrario se tendrá que utilizar mínimos

cuadrados pesados. Para este propósito se prepararon tres disoluciones madres de vitamina C a una concentración de 1000 mg/L cada una. De cada una de estas madres se prepararon siete disoluciones patrón de concentraciones de 20, 40, y 100 mg/L. En el apéndice A-2, se presentan los resultados obtenidos para los tres niveles de concentración de la vitamina C, con sus respectivos promedios y desviaciones estándar. Los niveles de concentración se establecieron de acuerdo a los criterios de Taylor, los cuales deben ser bajo, mediano y alto, además no deben ser equidistantes.

En el Cuadro V se presentan los valores promedios (X) y las desviaciones estándar (S) para la vitamina C, a los diferentes niveles de concentración y en la Figura (9), se representan gráficamente la relación existente entre la S de las áreas obtenidas de los picos cromatográficos y sus respectivas concentraciones.

Cuadro V. Datos obtenidos para la determinación de la relación existente entre la desviación estándar y la concentración de vitamina C.

| Parámetro estadístico | Vitamina C (mg/L) | Area u.a |
|-----------------------|-------------------|----------|
| X | 20.04 | 549035 |
| Sn-1 | - | 2258 |
| X | 40.04 | 1035333 |
| Sn-1 | - | 6836 |
| X | 100.8 | 2420387 |
| Sn-1 | - | 7324 |

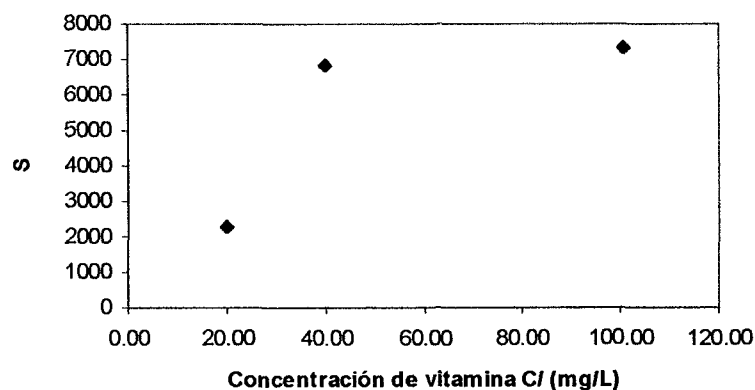


Figura 9. Variación de la desviación estándar de los valores de área con respecto a la concentración de vitamina C.

En la Figura 9 correspondiente a la vitamina C se observa un comportamiento no definido de la desviación estándar con respecto a la concentración. Para comprobar realmente si las desviaciones estándar son significativamente diferentes, se aplicó la prueba de Cochran conocida también como prueba de homogeneidad de varianzas, la cual aplica la siguiente fórmula: ⁴²

$$C = \frac{S^2}{\sum_i S_i^2} \quad (2)$$

de manera que a partir de los datos que se presentan en el Cuadro V se obtiene que:

$$C1 = \frac{(2258)^2}{(2258)^2 + (6838)^2 + (7324)^2} = 0.048$$

$$C2 = \frac{(6838)^2}{(2258)^2 + (6838)^2 + (7324)^2} = 0.44$$

$$C3 = \frac{(7324)^2}{(2258)^2 + (6838)^2 + (7324)^2} = 0.508$$

Dado que el valor crítico de la prueba de Cochran para un número de datos igual a 7, para cada ámbito de concentración, es de 0.6771 a un nivel de confianza del 95% ($\alpha=0.05$), se tiene que el $C_{exp} < C_{tabulado}$ en los tres casos, por lo tanto se demuestra que las varianzas a estos niveles de concentración no difieren significativamente entre sí y que existe un comportamiento homocedástico en el ámbito de concentración de 20 a 100 mg/L. Al determinar un comportamiento homocedástico en el ámbito de trabajo, permite utilizar el programa de mínimos cuadrados simples para el cálculo de los límites de detección y de cuantificación, así como también en el cálculo de la concentración de vitamina C en las muestras de jugo de naranja.

La precisión de la medida también se estudió determinando la repetitividad de la medida del instrumento, al inyectar siete veces una misma disolución de jugo de naranja. En el Cuadro VI se muestran los resultados de estas réplicas. De acuerdo con el coeficiente de variación obtenido (D.E.R), la repetitividad del instrumento es del 0.4 % para la vitamina C a un nivel de concentración intermedio.

Cuadro VI. Valores obtenidos de una disolución de jugo de naranja BOR para la determinación de la repetitividad del instrumento.

| Area/u.a | Sn-1 | Expresada como Cn vitamina C mgL ⁻¹ |
|----------|------|---|
| 1418981 | 6111 | 57 -58 |

La precisión se estudió también sobre el método, para esto se evaluó la dispersión de siete disoluciones de la muestra de jugo de naranja; considerando todo el procedimiento, desde la preparación de la muestra hasta la medición del analito por parte del instrumento. En el apéndice A-3 se observan los datos obtenidos para la inyección de las siete disoluciones de la muestra para el análisis de precisión de vitamina C y en el cuadro VII se muestra un resumen del análisis estadístico de estos resultados. Según Snyder y colaboradores para un análisis de HPLC, el % D.E.R para la precisión del método, debe ser menor del 10 %, según la complejidad de la matriz,³⁹ por lo que se puede concluir que la precisión del método es adecuada.

Cuadro VII. Determinación de la precisión del método de análisis para la vitamina C.

| Muestra BOR | Vitamina C/mg L ⁻¹ |
|---|-------------------------------|
| 1. Número de datos (n) | 7 |
| 2. Media mg/L (x) | 33.1 |
| 3. Desviación estándar (s) | 0.5 |
| 4. DER (%) | 1.62 |
| 5. Intervalo de confianza del 95% de la media | (32.6-33.6) |

3.1.1.7 Linealidad y ámbito de trabajo.

La linealidad del método analítico propuesto se determinó al estudiar la proporcionalidad entre la concentración de vitamina C y su respuesta en unidades de área del pico cromatográfico en un amplio ámbito de concentración. Además se determinó conjuntamente el ámbito de trabajo, es decir el intervalo comprendido entre la concentración mínima y máxima de vitamina C, para la cual el método es probado y dentro del cual la desviación estándar de las áreas es independiente de la concentración, para lo cual se puede utilizar el método de ajuste por mínimos cuadrados clásicos para efectuar las mediciones de los patrones y de las muestras. En el Cuadro VIII se muestra el ámbito de linealidad, la recta de mejor ajuste de la curva de calibración y el coeficiente de correlación para cada analito.

Cuadro VIII. Ambito lineal, ecuación de la recta de mejor ajuste de la curva de calibración y su respectivo coeficiente de correlación para la vitamina C.

| Analito | Función de la recta y coeficiente de correlación (r) | Ambito de linealidad (mg/L) | Ambito de trabajo (mg/L) |
|------------|--|-----------------------------|--------------------------|
| Vitamina C | $y = 18128x + 42123$ $R = 0.9999$ | 10-130.0 | 20.04 -100.0 |

En la Figura 10 se muestra la gráfica de linealidad para la vitamina C. Al evaluar el estimador de regresión en un intervalo de confianza dado, se puede concluir varios aspectos. En este caso, se concluye a partir del coeficiente de regresión lineal ($r = 0.9999$) que existe linealidad para el modelo propuesto, lo cual se denota gráficamente, sin embargo el mejor indicador del modelo lineal no es r sino una prueba estadística,³⁵ en la cual se calcula un valor de t_r con $n-2$ grados de libertad y se compara con el valor de t tabulado de dos colas para un nivel de confianza establecido. Esta prueba estadística se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$tr = \frac{|r|\sqrt{(n-2)}}{\sqrt{(1-r^2)}} \quad (3)$$

sustituyendo en la ecuación (3) se tiene que tr es:

$$tr = \frac{0.9999\sqrt{(6-2)}}{\sqrt{(1-0.9999^2)}} = 199.98$$

para $n-2=4$ grados de libertad el t tabulado es 2.78 a un nivel de confianza del 95%. En este caso, la hipótesis nula es la no correlación entre "x" y "y". Dado que el valor observado de tr es mayor que el t tabulado, se rechaza la hipótesis nula, la cual implica que si existe correlación lineal entre "x" y "y" a un nivel de confianza del 95%.

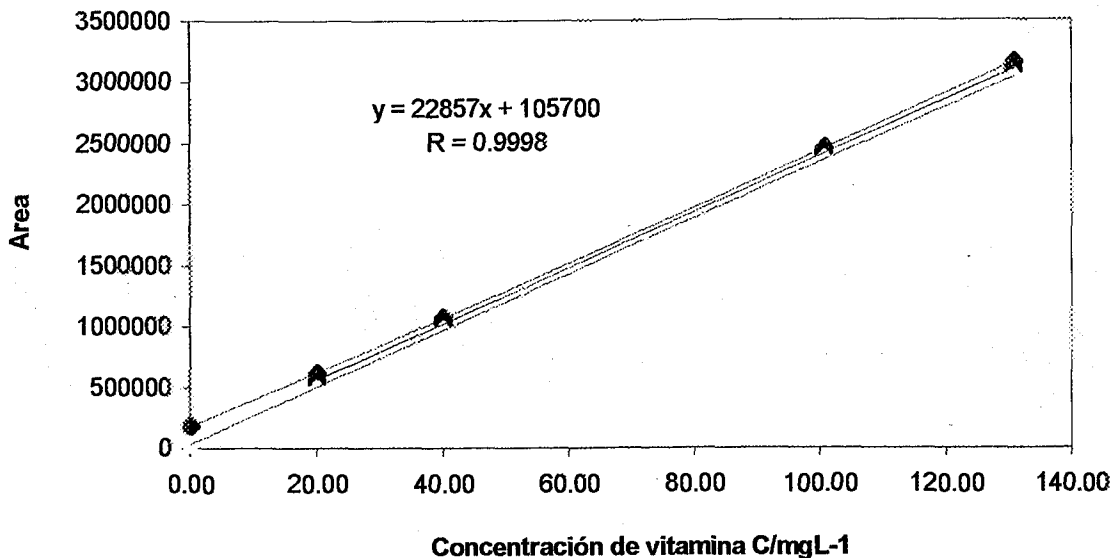


Figura 10. Evaluación de la linealidad y del ámbito lineal para el análisis de la vitamina C por HPLC.

Los límites de confianza para la pendiente y para la ordenada en el origen se calculan a partir de los datos obtenidos de la Figura 10. En el cuadro IX se muestran los límites de confianza para la pendiente y para la intersección para la vitamina C.

Cuadro IX. Límites de confianza para la pendiente: b y para la ordenada en el origen: a para la vitamina C, a un nivel de confianza del 95% obtenidos por el método de HPLC.

| Analito | $b \pm t*s_b$ | $a \pm t*s_a$ |
|------------|---------------------|-----------------------|
| Vitamina C | $18128 \pm 2.78*84$ | $42122 \pm 2.78*8056$ |

3.1.1.8 Límites de detección y de cuantificación

El límite de detección se define como la menor concentración de analito que puede ser detectada con un 95% de confianza de que la señal obtenida no se debe a un falso positivo.⁴³ Por otro lado el límite de cuantificación que es el límite más bajo de concentración medible debe ser al menos 3.3 veces al límite de detección, lo que equivale a unas 10 veces la desviación estándar medida a concentración nula de analito.

La obtención del límite de detección y de cuantificación se obtuvieron por mínimos cuadrados simples, pues como se mencionó anteriormente se comprobó que existe homocedasticidad dentro del ámbito de trabajo establecido. Estos dos parámetros analíticos se determinaron por tres métodos diferentes: el de Hubaux,³³ Mayer y Zund³⁴ y Miller y Miller.³⁵ El método de Miller y Miller así como el de Mayer y Zund utilizan las gráficas de linealidad para determinar estos parámetros. Por otro lado para el método de Hubaux se debió seguir varios requisitos:

1. La curva de calibración, debe estar compuesta por cinco patrones.
2. Entre la concentración mayor y la menor debe haber un factor de 20, es decir que la concentración del patrón más concentrado sea 20 veces mayor a la del menos concentrado.
3. La distribución de los patrones debe ser: cinco patrones a baja concentración, uno a mediana concentración y dos a alta concentración.

En el cuadro X se comparan los valores obtenidos del límite de detección y del límite de cuantificación para la vitamina C. En este caso, estos dos parámetros analíticos se determinaron únicamente por el método de Miller y Miller y Mayer y Zund. En el apéndice A-4 se describen y se muestran los resultados de estas pruebas.

Cuadro X. Comparación de los resultados para la obtención del límite de detección (LDD) y el de cuantificación (LDC).

| Vitamina C | | |
|-----------------|--|---|
| Método | Límite de detección LDD mg/L \pm 0.02 | Límite de cuantificación LDC mg/L \pm 0.02 |
| Miller y Miller | 1.93 | 6.43 |
| Mayer y Zund | 3.23 | 6.37 |
| | | |

3.1.1.9 Exactitud.

El estudio de la exactitud para la metodología propuesta se determinó de dos formas diferentes:

(a)- Mediante el estudio de la recuperación de alícuotas de vitamina C añadidos a una muestra de jugo de naranja. El porcentaje de recuperación se llevó a cabo únicamente a un nivel de mediana concentración comprendida dentro del ámbito de trabajo del sistema. A este nivel de concentración se realizaron siete determinaciones independientes de una muestra enriquecida, a la vez, se obtuvo siete determinaciones independientes de la muestra sin enriquecer.

Se utilizó la prueba t de Student para verificar si el valor medido difiere o no significativamente del valor aceptado como referencia. Este valor t se calcula como:³⁵

$$t_{\text{exp}} = \frac{(100 - R)}{RSD * \sqrt{n}} \quad (4)$$

donde R es el valor porcentual obtenido, n número de muestras y RSD es la desviación estándar relativa.

En el caso de la vitamina C, se enriqueció una muestra con una concentración de 20.02 mg/L, la recuperación (R) para n=7 medidas independientes es del 93.13 %, la desviación estándar es de 2.8 y la desviación estándar relativa es del 3.04 %, por lo tanto la t de Student calculada es de 0.85 y la t tabulada para 6 grados de libertad y a un nivel de confianza del 95 % es de 2.45. De esta forma el $t_{\text{exp}} < t_{\text{tabulado}}$ por lo que se puede concluir que no hay diferencia significativa con el 100 % de recuperación y la veracidad de la metodología propuesta es apropiada para la vitamina C.

(b)- La exactitud del método se puede determinar a partir del estudio de la proximidad entre el valor obtenido y el valor verdadero del contenido de vitamina C, en una muestra de jugo de naranja. Por esta razón, se compararon los resultados obtenidos mediante la metodología analítica propuesta para un jugo determinado con los obtenidos por un método oficial. En el caso de la vitamina C se comparó con el método oficial AOAC que es el método volumétrico 2,6-dicloroindofenol. En el Cuadro XI se presentan los resultados obtenidos para una muestra de jugo de naranja BOR; estos resultados se expresan como mg/L en el caso de la vitamina C.

Cuadro XI. Comparación de las concentraciones obtenidas por el método de HPLC propuesto y el método oficial volumétrico del 2,6-dicloroindofenol.

| Vitamina C Muestra BOR | Metodo de HPLC propuesto | Metodo volumétrico 2,6-dicloroindofenol |
|-----------------------------------|---------------------------------|--|
| 1 | 340 | 314.3 |
| 2 | 330 | 313.4 |
| 3 | - | 314.4 |
| Media | 335 | 314.0 |
| s | 7 | 0.6 |
| % DER | 2.1 | 0.19 |

Mediante pruebas de significancia se compararon las medias obtenidas por los dos métodos descritos para vitamina C; para esto se toma como hipótesis nula que los dos métodos dan el mismo resultado, de esta forma se debe comprobar si $(X_1 - X_2)$ difiere en forma significativa de cero. Pero antes de llevar a cabo dicha prueba, es importante comparar si las desviaciones estándar obtenidas por ambos métodos difieren o no significativamente, para esto se aplica la prueba F de dos colas la cual considera la razón de las dos varianzas muestrales y está dada por la siguiente ecuación: ³⁵

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2} \quad (5)$$

A partir del Cuadro XI que muestra los datos para la vitamina C se calculó el valor de F como:

$$F_{1,2} = \frac{7^2}{0.5^2} = 196$$

El valor crítico obtenido para $F_{1,2}$ es 38.51 ($\alpha=0.05$). Debido a que el valor calculado de F es mayor al tabulado, se demuestra que hay diferencia significativa entre las dos varianzas al 95% de confianza, por lo tanto se debe calcular el t mediante la siguiente ecuación:

$$t = \frac{(x_1 - x_2)}{\sqrt{\left(\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}\right)}} \quad (6)$$

sustituyendo los valores del cuadro en la ecuación anterior, se determina que el valor de t es

$$t = \frac{(335 - 314)}{\sqrt{\left(\frac{7^2}{2} + \frac{0.5^2}{3}\right)}} = 4.24$$

Los grados de libertad se calculan mediante la siguiente fórmula:

$$GL = \frac{(s_1^2/n_1 + s_2^2/n_2)^2}{\left(\frac{s_1^2/n_1}{n_1} + 1\right) + \left(\frac{s_2^2/n_2}{n_2} + 1\right)} - 2 \quad (7)$$

sustituyendo los valores se obtiene un grado de libertad, por lo tanto el $t_{\text{crítico}}$ es 12.71 a un nivel de confianza del 95%, de esta forma se concluye que el $t_{\text{exp}} < t_{\text{tab}}$ lo cual implica que no se rechaza la hipótesis nula y que los valores medios de la concentración de vitamina C para los dos métodos dan el mismo resultado o sea que no difieren significativamente. Mediante estas pruebas queda demostrado a través de la comparación de la metodología analítica propuesta con método AOAC, que la exactitud del método HPLC para la determinación de vitamina C en el jugo de naranja es apropiada.

3.1.2 Validación del método HPLC, para la determinación de sacarosa, glucosa y fructosa.

3.1.2.1 Determinación de las condiciones óptimas para la determinación de azúcares.

Se optimizaron y se adaptaron las condiciones cromatográficas tomando como base de partida las especificaciones que venían con la columna utilizada "Econospha NH2 marca Alltech de 250 mm*4.0 mm con un diámetro de poro de 5 μm . Se empleó como fase móvil acetonitrilo : agua bidestilada en una relación 80:20; filtrada por milliporo de 0.45 μm y posteriormente degasificada. El flujo fue de 2.0 mL/min y la temperatura de la columna a temperatura ambiente. En la Figura 11 se muestra el cromatograma obtenido para una disolución patrón de 0.40 % m/v en cada uno de los azúcares. En el cromatograma se observan cuatro picos, en donde el primero corresponde al acetonitrilo, el segundo a la fructosa a un tiempo de retención de 3.98 minutos, el tercero corresponde a glucosa con un tiempo de retención de 4.44 minutos y el cuarto a sacarosa con un tiempo de retención de 6.35 minutos.

Una vez identificado los picos se realizó el estudio de factor de asimetría al 10 % de altura obteniéndose para la glucosa fructosa y sacarosa un valor de 1.0, 1.03, 1.03 respectivamente, por lo que se concluye que la simetría de los picos es adecuada según Snyder y colaboradores.³⁹ Por medio de la ecuación (1) mostrada anteriormente para la determinación de la resolución se determinó que entre la fructosa y la glucosa es de 1.2 y entre la glucosa y la sacarosa es de 3.8. Según Snyder y colaboradores ambos valores son aceptables para obtener una separación excelente. En la Figura 12, se muestra un cromatograma obtenido para una muestra de jugo de naranja.

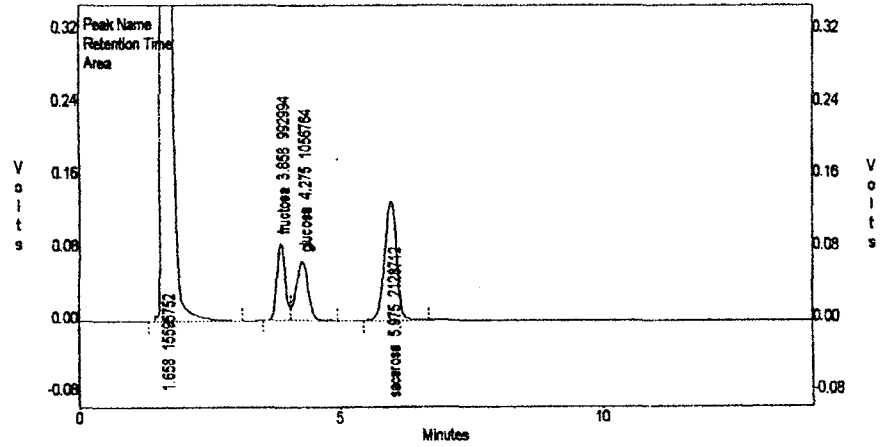


Figura 11. Cromatograma HPLC para una disolución estándar de glucosa, fructosa y sacarosa. Pico 1: acetonitrilo, pico 2: fructosa, pico 3: glucosa, pico 4: sacarosa.

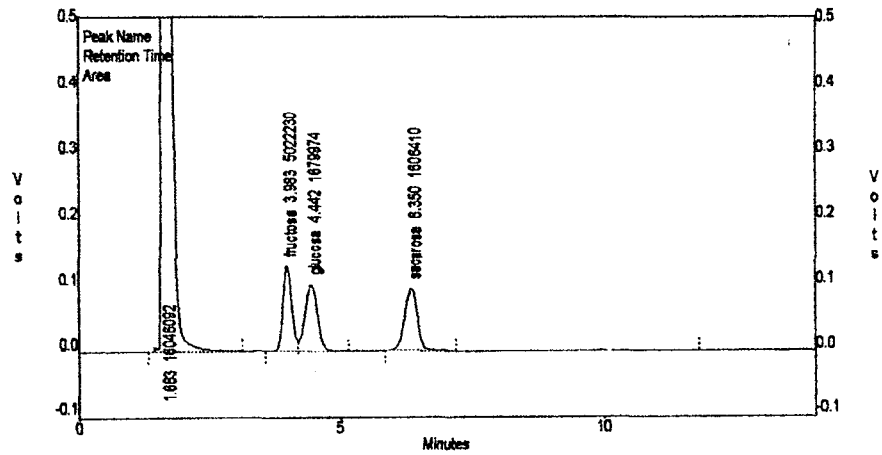


Figura 12. Cromatograma HPLC para una muestra de jugo de naranja BOR. Pico 1: Acetonitrilo, pico 2: fructosa, pico 3: glucosa, pico 4: sacarosa.

3.1.2.2 Selectividad o Especificidad.

En las Figuras 11 y 12 se comparan las respuestas para la glucosa, fructosa y sacarosa de una disolución estándar que contiene los tres analitos, con la respuesta en una muestra de jugo de naranja BOR. Se puede apreciar como los dos picos de la fructosa aparecen a un tiempo de retención aproximado de 3.9 minutos, el de la glucosa a 4.4 minutos y el de la sacarosa a 6.0 minutos. Al calcular los factores de capacidad para la glucosa y fructosa tanto en el cromatograma 11 y 12 se obtuvo que para la glucosa $k' = 1.06$ y para la fructosa $k' = 0.86$, obteniéndose de esta forma un factor de selectividad de 1.30; para el caso del cromatograma 12 correspondiente a una muestra de jugo de naranja el factor de selectividad fue de 1.30; de esta forma al obtener dos factores de selectividad idénticos, se concluye que la selectividad encontrada, es apropiada para el método de análisis de los tres azúcares por HPLC.

3.1.2.3 Precisión.

El estudio de precisión para la determinación de sacarosa, glucosa y fructosa, por HPLC, se llevó a cabo de la misma forma que para la vitamina C. Siguiendo el procedimiento del punto 3.1.1.6 se prepararon tres disoluciones madres de sacarosa, glucosa y fructosa, a una concentración del 2.000% m/v en cada azúcar. A partir de cada una de estas madres se prepararon siete disoluciones patrón de concentración de 0.08, 0.6 y 1.2 % (m/v) para cada uno de los azúcares. En el apéndice A-2, se presentan los resultados obtenidos para los tres niveles de concentración de la glucosa, fructosa y sacarosa con sus respectivos promedios y desviaciones estándar.

En los Cuadros XII, XIII y XIV se presentan los valores promedios (\bar{x}) y las desviaciones estándar para cada uno de estos compuestos a los diferentes niveles de concentración y en las Figuras 13, 14 y 15 se representan gráficamente la relación existente entre la S de las áreas obtenidas de los picos cromatográficos y sus respectivas concentraciones.

De igual forma que se hizo para la vitamina C, se aplicó la prueba de Cochran para los tres azúcares, para determinar si las varianzas son homogéneas ó heterogéneas a los niveles de concentración estudiados. Se obtuvo un comportamiento homocedástico en los tres rangos de concentración, lo que quiere decir que las varianzas de los tres niveles de glucosa, fructosa y sacarosa son homogéneas y no son significativamente diferentes entre sí a un nivel de confianza del 95 %; de igual forma que para la vitamina C, el comportamiento homocedástico en cada una de las curvas, permite utilizar el programa de mínimos cuadrados simples para el cálculo de los límites de detección y de cuantificación. En el Cuadro XV se muestran los resultados experimentales del valor de Cochran para cada nivel de concentración para la glucosa, fructosa y sacarosa.

Cuadro XII. Datos obtenidos para la determinación de la relación existente entre la desviación estándar y la concentración de glucosa.

| Parámetro estadístico | Glucosa (%m/v) | Area u.a |
|-----------------------|----------------|----------|
| X | 0.0801 | 338587 |
| Sn-1 | - | 6460 |
| X | 0.400 | 1657938 |
| Sn-1 | - | 8452 |
| X | 1.200 | 4964996 |
| Sn-1 | - | 14493 |

Cuadro XIII. Datos obtenidos para la determinación de la relación existente entre la desviación estándar y la concentración de fructosa.

| Parámetro estadístico | Fructosa (%m/v) | Area u.a |
|-----------------------|-----------------|----------|
| X | 0.0804 | 304866 |
| Sn-1 | - | 3644 |
| X | 0.402 | 1522950 |
| Sn-1 | - | 7604 |
| X | 1.210 | 4627709 |
| Sn-1 | - | 11622 |

Cuadro XIV. Datos obtenidos para la determinación de la relación existente entre la desviación estándar y la concentración de sacarosa.

| Parámetro estadístico | Sacarosa (%m/v) | Area u.a |
|-----------------------|-----------------|----------|
| X | 0.0802 | 304452 |
| Sn-1 | - | 5427 |
| X | 0.400 | 1598127 |
| Sn-1 | - | 8255 |
| X | 1.201 | 4856161 |
| Sn-1 | - | 13707 |

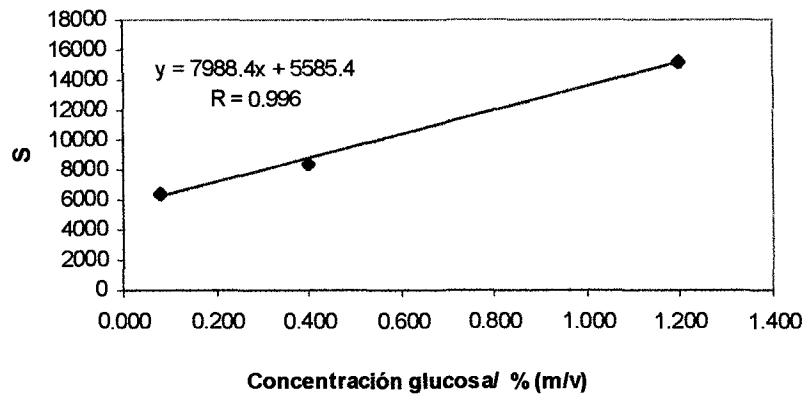


Figura 13. Variación de la desviación estándar de los valores de área con respecto a la concentración de glucosa.

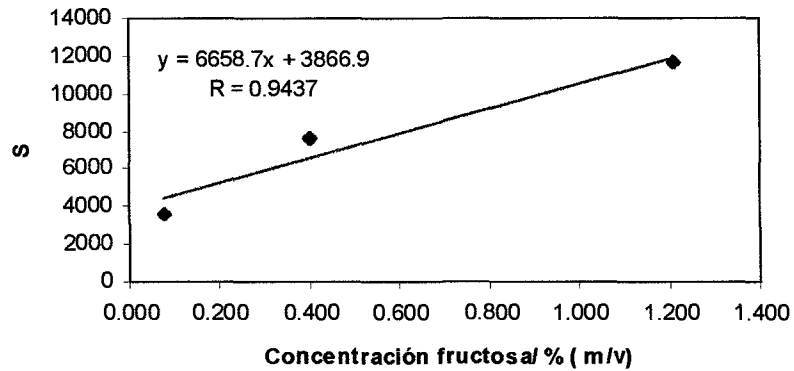


Figura 14. Variación de la desviación estándar de los valores de área con respecto a la concentración de fructosa.

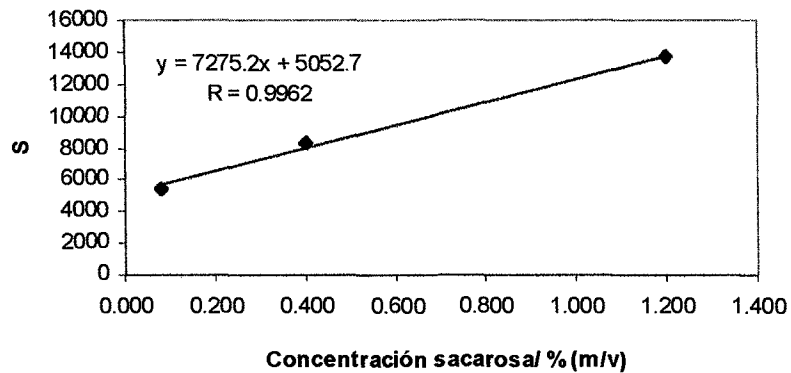


Figura 15. Variación de la desviación estándar de los valores de área con respecto a la concentración de sacarosa.

Cuadro XV. Valores obtenidos experimentalmente de la prueba de Cochran para cada nivel de concentración para la glucosa, fructosa y sacarosa.

| Valor Experimental de Cochran | Glucosa | Fructosa | Sacarosa |
|-------------------------------|---------|----------|----------|
| C1 | 0.129 | 0.064 | 0.1031 |
| C2 | 0.221 | 0.280 | 0.239 |
| C3 | 0.650 | 0.655 | 0.658 |

La precisión también se estudió determinando la repetitividad del instrumento, al inyectar siete veces una misma disolución de jugo de naranja. En el Cuadro XVI se muestran los resultados de estas réplicas.

Cuadro XVI. Valores obtenidos de una disolución de jugo de naranja BOR para la determinación de la repetitividad del instrumental.

| Area u. a | S _{n-1} | glucosa % (m/v) |
|-----------|------------------|-----------------|
| 1681823 | 316663 | 0.328-0.482 |

| Area u.a | S _{n-1} | fructosa % (m/v) |
|----------|------------------|------------------|
| 2004574 | 15505 | 0.521-0.529 |

| Area u.a | S _{n-1} | sacarosa % (m/v) |
|----------|------------------|------------------|
| 1610857 | 23297 | 0.397-0.409 |

La precisión también se estudió sobre el método; se siguió el mismo procedimiento que para la vitamina C. En el Cuadro XVII se muestra un resumen del análisis estadístico de estos resultados.

Cuadro XVII. Determinación de la precisión del método de análisis para la glucosa, fructosa y sacarosa.

| Muestra BOR | Glucosa |
|---|-------------|
| 1. Número de datos (n) | 7 |
| 2. Media % m/v (x) | 0.098 |
| 3. Desviación estándar | 0.002 |
| 4. DER (%) | 2.0 |
| 5. Intervalo de confianza del 95% de la media | 0.096-0.100 |

| Muestra BOR | Fructosa |
|--|-------------|
| 6. Número de datos (n) | 7 |
| 7. Media % m/v (x) | 0.100 |
| 8. Desviación estándar (s) | 0.002 |
| 9. DER (%) | 1.9 |
| 10. Intervalo de confianza del 95% de la media | 0.098-1.002 |

| Muestra BOR | Sacarosa |
|--|-------------|
| 11. Número de datos (n) | 7 |
| 12. Media % m/v (x) | 0.380 |
| 13. Desviación estándar (s) | 0.005 |
| 14. DER (%) | 1.3 |
| 15. Intervalo de confianza del 95% de la media | 0.375-0.385 |

La AOAC menciona que un valor entre 1.5 y 2.0% de la RSD es aceptable, mientras la USP indica que un % DER del sistema no debe sobrepasar el 2.0%, inyectando 5 veces la disolución estándar.

3.1.2.4 Linealidad y ámbito de trabajo.

Del mismo modo que en el punto 3.1.1.7, se estudió la linealidad y el ámbito de trabajo del método analítico propuesto para la glucosa, fructosa y sacarosa. En el Cuadro XVIII se muestra el ámbito de linealidad, la recta de mejor ajuste de la curva de calibración y el coeficiente de correlación para cada analito.

Cuadro XVIII. Ambito lineal, ecuación de la recta de mejor ajuste de la curva de calibración y su respectivo coeficiente de correlación para la glucosa, fructosa y sacarosa.

| Analito | Función de la recta y coeficiente de correlación (r) | Ambito de linealidad | Ambito de trabajo |
|----------|--|----------------------|-------------------|
| Glucosa | $y = 4137007x + 6429.8$ $R = 1.0000$ | 0.02-1.6 % m/v | 0.0801-1.201 %m/v |
| Fructosa | $y = 3818080x - 681.9$ $R = 1.0000$ | 0.02-1.6 % m/v | 0.0801-1.201 %m/v |
| Sacarosa | $y = 3995503x + 343.2$ $R = 0.9998$ | 0.02-1.6 % m/v | 0.0801-1.201 %m/v |

En las Figuras 16,17 y 18 se muestran las gráficas de linealidad para la glucosa, fructosa y sacarosa. También en este caso se evaluaron los estimadores de regresión a un intervalo de confianza del 95 % para la glucosa, fructosa y sacarosa, a partir de los cuales se pudo concluir que existe correlación lineal entre "x" y "y" . En el Cuadro XIX se presentan los t_r para las gráficas de linealidad de glucosa, fructosa y sacarosa.

Cuadro XIX. Valores de t_r encontrados para las gráficas de linealidad para la glucosa, fructosa y sacarosa.

| Analito | t_r | t_{tabla} y sus grados de libertad (ν) |
|----------|----------|---|
| Glucosa | ∞ | 2.45, ($\nu = 6$) |
| Fructosa | ∞ | 2.45, ($\nu = 6$) |
| Sacarosa | 173.18 | 2.45, ($\nu = 6$) |

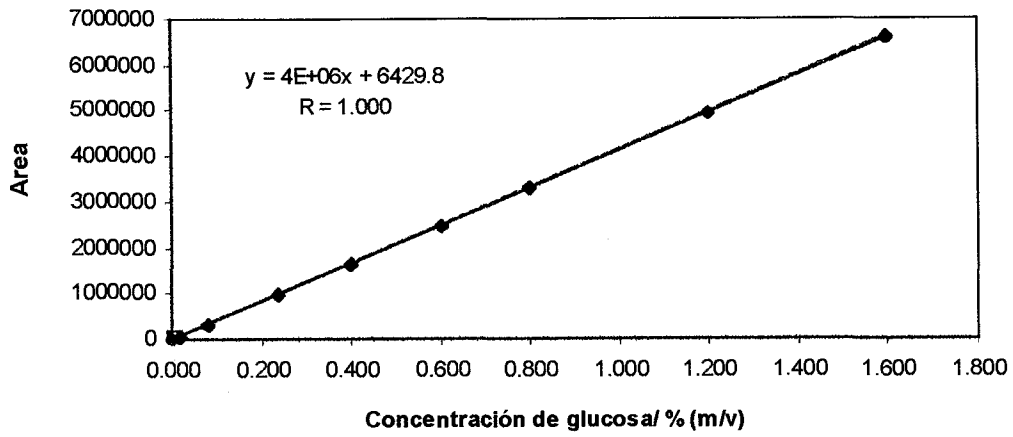


Figura 16. Evaluación de la linealidad y del ámbito lineal para el análisis de la glucosa por HPLC.

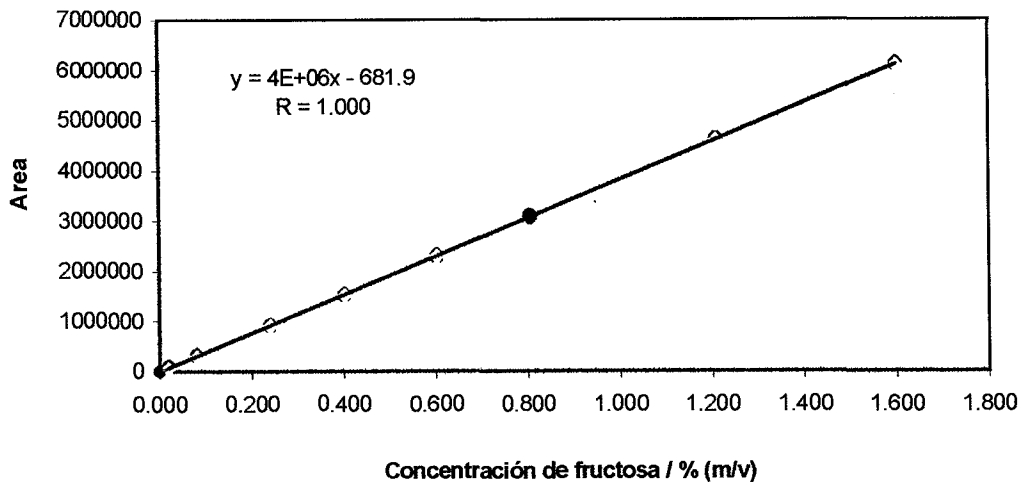


Figura 17. Evaluación de la linealidad y del ámbito lineal para el análisis de la fructosa por HPLC.

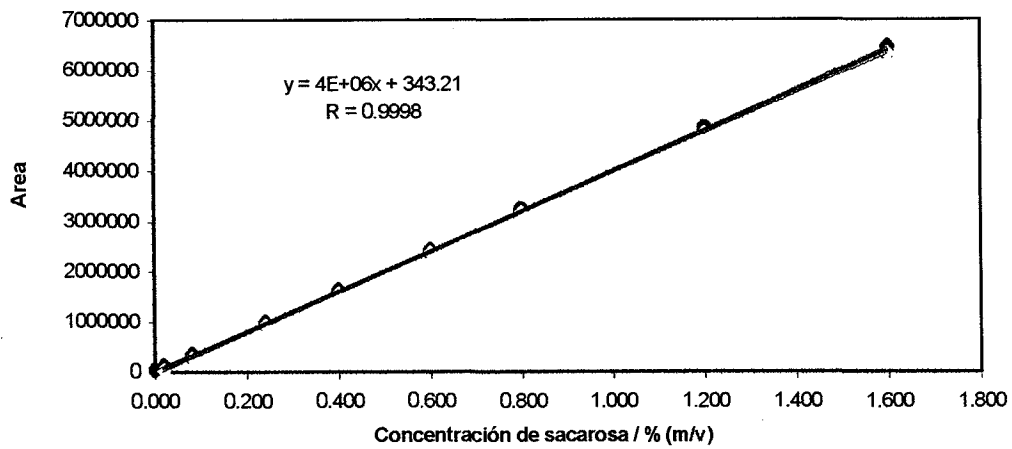


Figura 18. Evaluación de la linealidad y del ámbito lineal para el análisis de sacarosa por HPLC.

Los límites de confianza para la pendiente y para la ordenada en el origen se calculan a partir de los datos obtenidos de las figuras 17,18 y 19. En el cuadro XX se muestran los límites de confianza para la pendiente y para la intersección tanto para la glucosa, fructosa y sacarosa.

Cuadro XX. Límites de confianza para la pendiente: b y para la ordenada en el origen: a, para la glucosa, fructosa y sacarosa a un nivel de confianza del 95% obtenidos por el método de HPLC.

| Analito | $b \pm t * s_b$ | $a \pm t * s_a$ |
|----------|----------------------------|--------------------------|
| Glucosa | $4137007 \pm 2.45 * 9503$ | $6430 \pm 2.45 * 7680$ |
| Fructosa | $3818080 \pm 2.45 * 8904$ | $-682 \pm 2.45 * 7225$ |
| Sacarosa | $3995503 \pm 2.45 * 19301$ | $343.2 \pm 2.45 * 23874$ |

3.1.2.5 Límites de detección y de cuantificación.

En el cuadro XXI se comparan los diferentes valores obtenidos de los límites de detección y de los límites de cuantificación para la glucosa, fructosa y sacarosa. En el apéndice A-4 y A-5 se describen y se muestran los resultados de estas pruebas.

3.1.2.6 Exactitud.

El estudio de la exactitud para la metodología propuesta para el análisis de glucosa, fructosa y sacarosa se determinó de la misma forma que en el punto 3.1.1.9, (a)- Agregando alícuotas de glucosa, fructosa y sacarosa a la muestra de jugo de naranja BOR De igual manera, el estudio de recuperación se realizó a un nivel de mediana concentración comprendida dentro del ámbito de trabajo. El % D.E.R para las siete determinaciones de la muestra sin enriquecer fue de 2.04, 1.98 y 1.32 respectivamente. Se aplicó el mismo tratamiento estadístico que en el punto 3.1.1.9 para los tres azúcares y en los tres casos el t experimental fue menor que el t tabulado (2.45) a un nivel de confianza del 95%. En el Cuadro XXII se muestran los resultados obtenidos para la determinación del porcentaje de recuperación para los tres azúcares.

Cuadro XXI. Comparación de los resultados para la obtención del límite de detección (LDD) y el de cuantificación (LDC).

| Glucosa | | |
|-----------------|--|---|
| Método | Límite de detección LDD % (m/v) \pm 0.001 | Límite de cuantificación LDC % (m/v) \pm 0.001 |
| Miller y Miller | 0.010 | 0.034 |
| Mayer y Zund | 0.004 | 0.009 |
| Hubaux | 0.004 | 0.012 |

| Fructosa | | |
|-----------------|--|---|
| Método | Límite de detección LDD % (m/v) \pm 0.001 | Límite de cuantificación LDC % (m/v) \pm 0.001 |
| Miller y Miller | 0.010 | 0.034 |
| Mayer y Zund | 0.005 | 0.009 |
| Hubaux | 0.002 | 0.006 |

| Sacarosa | | |
|-----------------|--|---|
| Método | Límite de detección LDD % (m/v) \pm 0.001 | Límite de cuantificación LDC % (m/v) \pm 0.001 |
| Miller y Miller | 0.027 | 0.089 |
| Mayer y Zund | 0.012 | 0.024 |
| Hubaux | 0.006 | 0.020 |

Cuadro XXII. Determinación del porcentaje de recuperación para la muestra de jugo de naranja BOR enriquecida a un nivel de mediana concentración.

| Compuesto | Muestra enriquecida | % de recuperación | t experimental |
|-----------------|---------------------|-------------------|----------------|
| glucosa (%m/v) | 0.2002 | 94.9 | 0.73 |
| fructosa (%m/v) | 0.2001 | 94.7 | 0.61 |
| sacarosa (%m/v) | 0.2050 | 94.6 | 0.22 |

(b)-La exactitud también se evaluó comparando la metodología propuesta de HPLC para la determinación de azúcares con el método oficial de Lane y Eynon. En el Cuadro XXIII se presentan los resultados obtenidos para una muestra de jugo de naranja HO. Estos resultados se expresan como porcentaje (m/v) en el caso de la sacarosa y de los azúcares reductores. Se aplicó una prueba de estadística para comparar si las medias obtenidas por los dos métodos descritos anteriormente difieren o no significativamente; para esto se tomó como hipótesis nula que los dos métodos dan el mismo resultado. Antes de aplicar esta prueba, es necesario comparar si las desviaciones estándar obtenidas por ambos métodos difieren o no significativamente, para esto se aplicó la prueba F de dos colas, cuya fórmula se da en la ecuación (5); al sustituir los respectivos valores, se encontró que en el caso de la sacarosa las desviaciones estándar de las poblaciones no son significativamente diferentes a un nivel de confianza del 95%, por lo que se calculó una estimación conjunta de la desviación estándar mediante la siguiente fórmula:

Cuadro XXIII. Comparación de las concentraciones obtenidas por el método de HPLC propuesto y el método oficial volumétrico de Lane y Eynon.

| Azúcares reductores (Glucosa + Fructosa) Muestra HO | Metodo de HPLC propuesto | Metodo volumétrico Lane y Eynon |
|--|--------------------------|---------------------------------|
| 1 | 3.88 | 3.613 |
| 2 | 3.81 | 3.607 |
| 3 | - | 3.613 |
| Media | 3.84 | 3.611 |
| s | 0.05 | 0.003 |
| DSR | 1.3 | 0.08 |

$$s^2 = \frac{\{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2\}}{n_1 + n_2 - 2} \quad (8)$$

Así el valor de la desviación estándar conjunta para la sacarosa es de 0.23 y el t calculado mediante la fórmula:

$$t = \frac{(x_1 - x_2)}{s * \sqrt{\left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}\right)}} \quad (9)$$

es de 0.33 y el t crítico para 3 grados de libertad a un 95% de confianza es de 3.18, por lo tanto no se rechaza la hipótesis nula y las medias obtenidas mediante los dos métodos para la concentración de sacarosa no difieren significativamente entre sí.

En el caso de los azúcares reductores las desviaciones estándar de las poblaciones si defieren significativamente entre sí al aplicar la prueba F de dos colas. De la misma forma que se hizo para la vitamina C en el punto 3.1.1.10, se calculó el t experimental mediante la ecuación (6) dando 11.22. El número de grados de libertad obtenido es de 1, así el t tabulado es de 12.71 por lo que como el t tabulado > t experimental se acepta la hipótesis nula de que para los azúcares reductores presentes en la muestra las dos medias son iguales o sea que no hay diferencia significativa en las concentraciones de las dos medias dadas por los dos métodos.

Mediante estas pruebas queda demostrado a través de la comparación de la metodología analítica propuesta con el método de Lane y Eynon, que la exactitud del método HPLC para la determinación de sacarosa y azúcares reductores en jugo de naranja, es apropiada.

3.3 Resultados obtenidos con los jugos de naranja.

Se determinó la concentración de sólidos solubles presentes en cada muestra mediante refractometría, que es el método oficial recomendado por la AOAC y por la norma ICAITI. Para esto se realizó una curva de calibración de porcentaje de sacarosa contra índice de refracción y grados Brix como se muestra en la Figura 19.

La concentración de sólidos solubles del jugo de naranja también se puede expresar en grados Brix; los grados Brix son una medida de densidad en donde un grado Brix es la densidad que tiene a 20 °C una disolución de sacarosa al 1%. En el Cuadro XXIV se expresan los resultados obtenidos de los °Brix para las 15 muestras de jugo de naranja; y en la Figura 20 se muestra el diagrama de control para las muestras de jugo con respecto a los °Brix. Se observa que la media obtenida es de 12.82 con un intervalo de confianza de 11.89-13.75. Dentro de este intervalo se encuentra el 46.6 % de las muestras de jugo de

naranja y solamente tres de ellas se encuentran por debajo de este límite. Algunos autores recomiendan un mínimo de °Brix igual a 10; si se observa el diagrama de control de la Figura 20 se puede notar que solo una muestra (MN) se encuentra por debajo de este límite y las demás muestras están por encima de este valor. Para comprobar si los resultados obtenidos variaban de forma significativa con respecto al valor mínimo se aplicó un prueba de t de student a un nivel de confianza del 99 % para 1 grado de libertad, de la cual se pudo concluir que solo tres de ellas difieren en forma significativa del valor mínimo, estas son las muestras BO, BCV y JB. (Ver apéndice A-6.1). En el mismo cuadro se expresan los resultados obtenidos de los azúcares totales, en la Figura 21 se muestra el diagrama de control para las muestras de jugo de naranja, se observa que la media obtenida para los azúcares totales es de 11.03 % (m/v), dentro de este intervalo solo se encuentra un 46.6 % de las muestras, también se observa que solo dos muestras la HO y la MN que son jugos naturales están por debajo del límite de confianza menor, con un porcentaje de azúcares totales igual a 8.1 y 8.0 respectivamente.

Dentro de las normas estudiadas no se reporta un valor mínimo o máximo de la cantidad de azúcares totales, por lo que no fue posible realizar una prueba de significancia de estos resultados.

Se realizó un análisis comparativo entre el porcentaje (m/m) de azúcares totales y sólidos solubles llegando a la conclusión que un 70 % de los sólidos solubles son azúcares, esta comparación se puede ver en el cuadro XXIV.

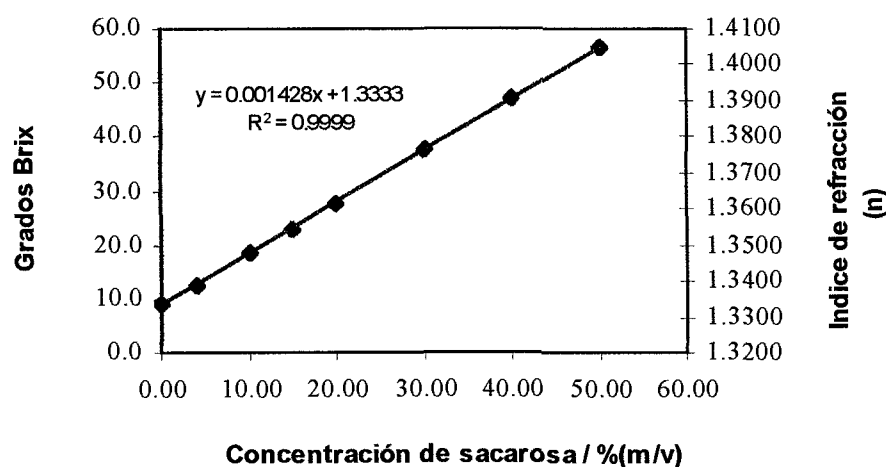


Figura 19. Curva de calibración de porcentaje de sacarosa contra índice de refracción y grados Brix

Cuadro XXIV. Comparación del contenido de azúcares totales, sólidos solubles y grados Brix obtenidos mediante HPLC y refractometría.

| | Código del jugo de naranja | Azúcares totales (% m/m) | Sólidos solubles (% m/m) ± 0.5 | Grados Brix ± 0.1 |
|-----------|-----------------------------------|---------------------------------|---------------------------------------|--------------------------|
| 1 | AU | 10.0 ± 0.8 | 10.9 | 11.2 |
| 2 | HO | 8.1 ± 0.7 | 10.6 | 11.0 |
| 3 | MN | 8.0 ± 0.7 | 9.2 | 9.5 |
| 4 | SF | 10 ± 1 | 12.7 | 12.7 |
| 5 | OJ | 11.3 ± 0.5 | 13.1 | 13.4 |
| 6 | JND | 10.6 ± 0.4 | 11.0 | 11.0 |
| 7 | NDC | 11.8 ± 0.5 | 14.0 | 14.3 |
| 8 | BO | 13 ± 1 | 15.4 | 15.4 |
| 9 | BCV | 13.3 ± 0.6 | 14.6 | 15.0 |
| 10 | JB | 12.5 ± 0.5 | 14.5 | 14.7 |
| 11 | VA | 9.7 ± 0.5 | 12.2 | 12.4 |
| 12 | RND | 13 ± 1 | 13.6 | 13.8 |
| 13 | LF | 10.7 ± 0.8 | 12.0 | 12.2 |
| 14 | CN | 10.5 ± 0.6 | 12.3 | 12.4 |
| 15 | RDB | 12.9 ± 0.6 | 13.1 | 13.3 |

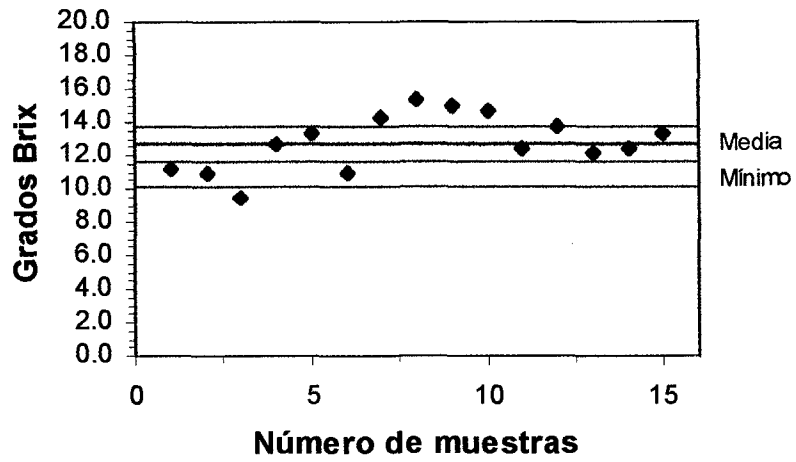


Figura 20. Diagrama del porcentaje de grados Brix (encontrados mediante refractometría) en los jugos de naranja.

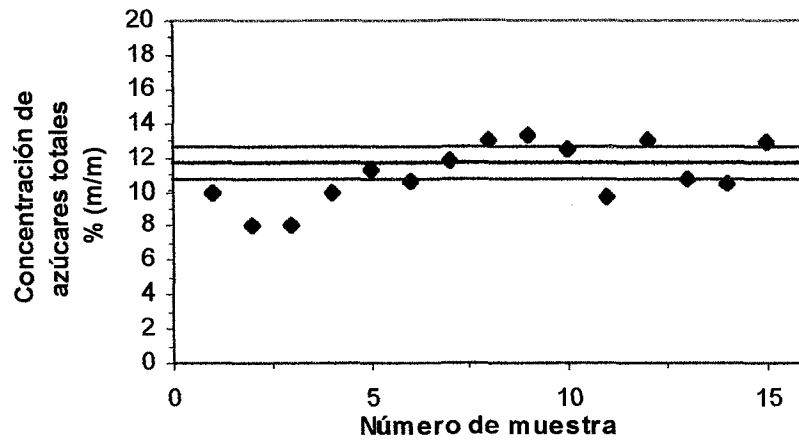


Figura 21. Diagrama de la concentración de azúcares totales (encontrados mediante el método de HPLC) en los jugos de naranja.

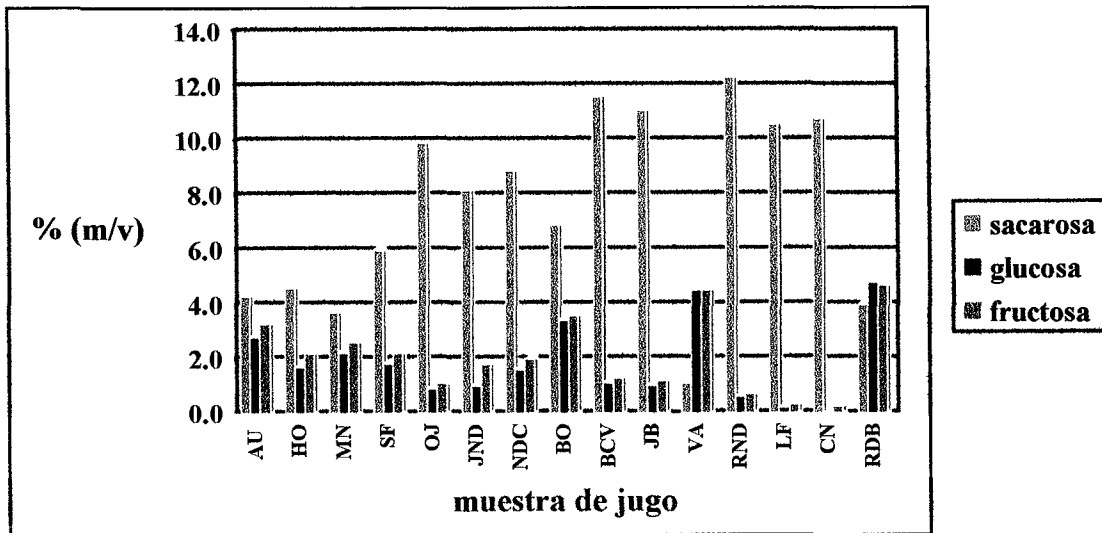


Figura 22. Diagrama de la concentración de azúcares en sus componentes individuales (glucosa, fructosa y sacarosa).

Cuadro XXV. Contenido de sacarosa, glucosa y fructosa % (m/v) en los diversos jugos de naranja por la técnica de HPLC.

| | Código del jugo de naranja | sacarosa | glucosa | fructosa |
|-----------|-----------------------------------|-------------------|-------------------------|--------------------|
| 1 | AU | 4.3 ± 0.4 | 2.8 ± 0.2 | 3.3 ± 0.7 |
| 2 | HO | 4.6 ± 0.5 | 1.7 ± 0.2 | 2.2 ± 0.4 |
| 3 | MN | 3.7 ± 0.5 | 2.2 ± 0.2 | 2.6 ± 0.5 |
| 4 | SF | 6.0 ± 0.4 | 1.8 ± 0.2 | 2.2 ± 0.4 |
| 5 | OJ | 9.9 ± 0.4 | 0.9 ± 0.2 | 1.1 ± 0.2 |
| 6 | JND | 8.2 ± 0.5 | 1.0 ± 0.2 | 1.8 ± 0.3 |
| 7 | NDC | 8.9 ± 0.4 | 1.6 ± 0.1 | 20 ± 0.4 |
| 8 | BO | 6.9 ± 0.4 | 3.4 ± 0.2 | 3.6 ± 0.7 |
| 9 | BCV | 11.6 ± 0.4 | 1.1 ± 0.2 | 1.3 ± 0.2 |
| 10 | JB | 11.1 ± 0.4 | 1.0 ± 0.2 | 1.2 ± 0.2 |
| 11 | VA | 1.1 ± 0.5 | 4.5 ± 0.2 | 4.5 ± 0.8 |
| 12 | RND | 12.3 ± 0.4 | 0.6 ± 0.2 | 0.7 ± 0.1 |
| 13 | LF | 10.6 ± 0.4 | 0.2 ± 0.2 | 0.32 ± 0.06 |
| 14 | CN | 10.8 ± 0.4 | no cuantificable | 0.25 ± 0.05 |
| 15 | RDB | 4.0 ± 0.5 | 4.8 ± 0.2 | 4.7 ± 0.9 |

Cuadro XXVI. Acidez total encontrada en los jugos de naranja indicada como porcentaje de ácido cítrico.

| | Código del jugo de naranja | Acidez total (% m/v ácido cítrico) | Acidez total (meq/L) | pH ± 0.01 |
|----|-----------------------------------|---|-----------------------------|------------------|
| 1 | AU | 0.577 ± 0.003 | 90.1 ± 0.4 | 3.62 |
| 2 | HO | 0.547 ± 0.003 | 85.5 ± 0.4 | 3.68 |
| 3 | MN | 1.119 ± 0.004 | 174.7 ± 0.4 | 3.14 |
| 4 | SF | 0.633 ± 0.003 | 85.1 ± 0.4 | 3.78 |
| 5 | OJ | 0.601 ± 0.003 | 93.8 ± 0.5 | 3.27 |
| 6 | JND | 0.841 ± 0.003 | 131.4 ± 0.4 | 3.56 |
| 7 | NDC | 0.685 ± 0.003 | 106.9 ± 0.4 | 3.53 |
| 8 | BO | 0.860 ± 0.004 | 134.3 ± 0.6 | 3.04 |
| 9 | BCV | 0.679 ± 0.004 | 105 ± 0.4 | 3.31 |
| 10 | JB | 0.747 ± 0.003 | 116.6 ± 0.5 | 3.15 |
| 11 | VA | 0.602 ± 0.003 | 94.0 ± 0.4 | 3.14 |
| 12 | RND | 0.547 ± 0.003 | 85.5 ± 0.4 | 2.85 |
| 13 | LF | 0.547 ± 0.002 | 85.5 ± 0.4 | 3.03 |
| 14 | CN | 0.565 ± 0.003 | 88.2 ± 0.4 | 3.13 |
| 15 | RDB | 0.188 ± 0.002 | 29.7 ± 0.4 | 2.67 |

Se puede observar en los resultados obtenidos que la muestra de jugo de naranja que presenta mayor acidez es la muestra MN con $(1.119 \pm 0.004) \%$ (m/v), por el contrario la muestra que presenta menor acidez es la muestra de refresco RDB con un valor de $0.188 \pm 0.002 \%$ (m/v) de jugo de naranja. De las 15 muestras analizadas, la media encontrada es de 0.65% (m/v) con un intervalo de confianza 0.54-0.70, dentro de este intervalo de confianza cae el 86.7 % de las muestras, también se observa que hay dos muestras con valores extremos que se salen del intervalo de confianza, estas son la muestra MN y la RDB, como se mencionó anteriormente. En la Figura 23 se muestra el diagrama de control en donde se da un valor mínimo y máximo de acidez recomendado por la norma ICAITI, como se puede ver en esta Figura, solo tres muestras (MN, JND, BO y JB) caen dentro de este intervalo representando solamente el 27 %, el otro 73 % se encuentra por debajo del valor mínimo permisible dado por la norma. A estas muestras que se encuentran por debajo de este límite se les aplicó una prueba de t de Student para comprobar si difieren o no significativamente de este valor y los resultados obtenidos indicaron que las muestras (AU, HO, OJ, NDC, BCV, RND y LF) no difieren significativamente a un nivel de confianza del 99 % para 2 grados de libertad y que las muestras (AU, SF, VA, LF, CN, y RDB) si difieren significativamente. (ver apéndice A-6.2)

Como última columna del cuadro XXVI está el valor de pH determinado para cada una de las muestras. Los jugos de frutas naturales como por ejemplo el jugo de naranja, sufren cambios normales a temperatura ambiente tales como la fermentación alcohólica, a cargo de levaduras, seguida de la oxidación del alcohol formado y de los ácidos de la fruta por levaduras formadoras de película o mohos que crecen en la superficie, si está expuesta al aire, o la oxidación del alcohol a ácido acético, si existen bacterias acéticas. Además de las fermentaciones alcohólicas habituales, el jugo de naranja puede experimentar otros cambios producidos por microorganismos,⁴⁴ tales como:

1. La fermentación láctica de los azúcares, casi siempre por bacterias lácticas heterofermentativas, como Lactobacillus arabinosus.
2. Fermentación de los ácidos orgánicos del jugo por bacterias lácticas, por ejemplo Lactobacillus pastorianus, ácido cítrico dando ácidos láctico y acético.

El pH de los alimentos es variable, aunque en la mayor parte de los casos son neutros o ácidos. Los alimentos con pH bajo (inferior a 4.5) como los jugos de naranja, no son fácilmente alterados por las bacterias, siendo por el contrario, más sensibles a las acciones de levaduras y mohos. Cada microorganismo tiene un pH mínimo, máximo y óptimo en función de su crecimiento y las levaduras y los mohos toleran más la acidez que las bacterias. Los alimentos con pH bajo suelen ser microbiológicamente más estables que los neutros. El pH no afecta únicamente a la velocidad de crecimiento de los microorganismos sino también al grado de supervivencia durante el almacenamiento, tratamiento térmico, desecación o cualquier otro sistema de conservación.⁴⁴ El jugo de naranja es ácido por naturaleza y su pH varía de 2.4 a 3.2, sin embargo los mohos pueden crecer en la superficie de este jugo y si está expuesto al aire, su alto contenido en humedad favorece a las levaduras y bacterias que crecen más rápidamente. La mayoría de las levaduras

fermentativas ven favorecido su desarrollo en los jugos de frutas: En el jugo de naranja natural se da un efecto buffer del ácido cítrico y citrato de sodio los cuales permiten retardar las fermentaciones ácidas (o alcalinas) con incremento de los productos y organismos obtenidos.⁴⁵

De allí la importancia de controlar este parámetro en los jugos. En la Figura 24 se muestra el diagrama de control del número de muestra respecto al valor de pH. La media encontrada para estos valores es de 3.26 y el intervalo de confianza es de 3.08 a 3.44. Solamente el 40 % de las muestras está dentro del intervalo de confianza mencionado. Por otro lado la línea de puntos verdes indica el valor permisible para los jugos de naranja que es 3.82 recomendado por la norma Británica.⁴⁵ Como se puede apreciar el 93.3 % de las muestras se encuentra por debajo de este valor. Al aplicar una prueba de t de Student para verificar si los valores obtenidos de las muestras difieren o no significativamente del valor dado por la norma se determinó que cinco de las muestras (AU, HO, SF, JND y NDC) no difieren significativamente del valor permisible a un nivel de confianza del 99 % con un grado de libertad.

Los valores bajos de pH en las 15 muestras analizadas, permite suponer que a los costarricenses les agrada los jugos de naranja con sabor ácido. Los resultados obtenidos se muestran en el Cuadro XXVI, en donde se observa que la muestra RDB es la que presenta el pH más bajo.

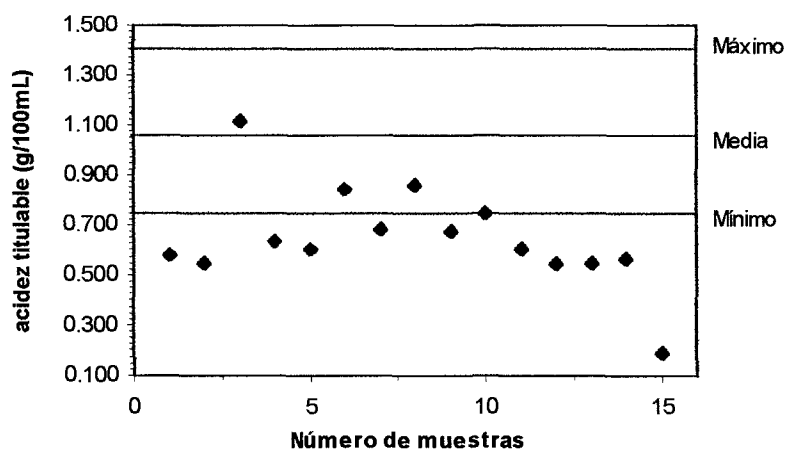


Figura 23. Diagrama de acidez titulable encontrada para los diferentes jugos de naranja.

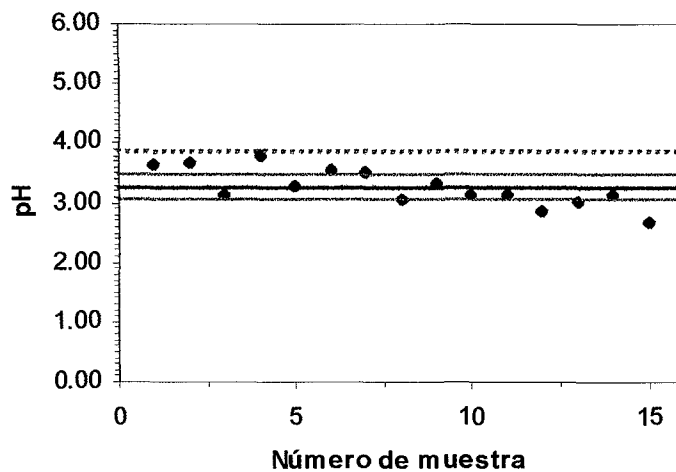


Figura 24. Diagrama de los valores de pH para los diferentes jugos de naranja.

La calidad de la naranja para la fabricación de jugo, se mide sobre todo, por el tanto por ciento de jugo, los sólidos solubles y el índice de maduración. Para la fabricación de jugos concentrados es conveniente un I.M de 14 a 16, pues se ha demostrado que los jugos con I.M bajos aportan sabores extraños. La norma ICAITI para jugo de naranja, ²⁵ reporta un valor mínimo y un valor máximo permisible para el índice de maduración en los jugos de naranja, estos valores son 7 y 18 respectivamente. En el Cuadro XXVII, se expresan los resultados obtenidos para la relación entre el contenido de grados Brix /acidez titulable. De las 15 muestras analizadas, la media de los resultados fue de 22.99 con un intervalo de confianza de 15.39-30.59. El 80 % de las muestras cae dentro de este intervalo de confianza, dentro del 20 % de las muestras que cae dentro de este intervalo están las muestras MN y RDB las cuales tienen valores de I.M iguales a 8.0 y 70.7 respectivamente. Como se comentó anteriormente, la muestra MN es la que presenta el valor más pequeño de °Brix, es por esta razón que dicha muestra tiene un I.M menor al de las demás muestras; por el contrario la muestra RDB a pesar de tener un valor de °Brix igual a 13.3, presenta un valor de acidez muy bajo, de allí que tenga el I.M más alto.

En la Figura 25 se muestran los dos valores mínimo y máximo permisible recomendados por la norma ICAITI, como se puede apreciar solo hay tres muestras que caen dentro de este intervalo (MN, JND y BO), las otras restantes están por encima del límite superior recomendado por la norma.

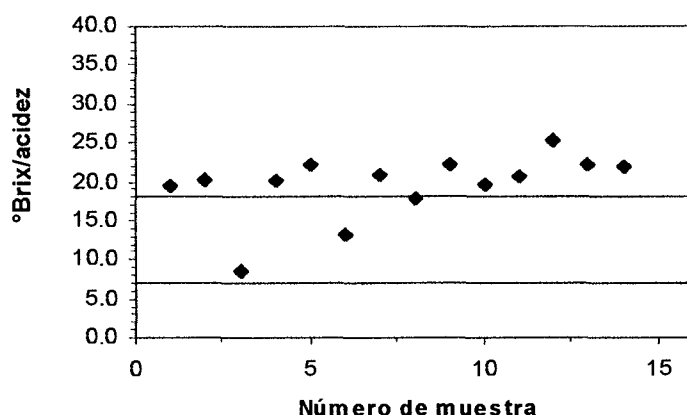


Figura 25. Diagrama de la relación entre el contenido de sólidos solubles en °Brix y acidez titulable.

Cuadro XXVII. Relación entre contenido de sólidos solubles en grados Brix, y acidez titulable, como ácido cítrico anhidro.

| | Código del jugo de naranja | Índice de Maduración (LM) |
|-----------|-----------------------------------|----------------------------------|
| 1 | AU | 19.4 ± 0.2 |
| 2 | HO | 20.1 ± 0.2 |
| 3 | MN | 8.5 ± 0.1 |
| 4 | SF | 20.1± 0.2 |
| 5 | OJ | 22.3 ± 0.2 |
| 6 | JND | 13.1 ± 0.1 |
| 7 | NDC | 20.9± 0.2 |
| 8 | BO | 17.9 ± 0.1 |
| 9 | BCV | 22.1 ± 0.2 |
| 10 | JB | 19.7 ± 0.2 |
| 11 | VA | 20.6 ± 0.2 |
| 12 | RND | 25.2 ± 0.2 |
| 13 | LF | 22.3± 0.2 |
| 14 | CN | 21.9 ± 0.2 |
| 15 | RDB | 70.7± 0.9 |

A estas muestras se les aplicó una prueba de t de Student para comprobar si difieren o no significativamente de este valor y se determinó que solamente la muestra de refresco RDB difiere en forma significativa, a un nivel de confianza del 99 %. (Ver apéndice A-6.3)

La turbidez de un jugo se mide por la inversa del porcentaje de transmisión de la luz y es un factor de calidad, ya que los jugos de naranja clarificados no tienen valor comercial. La turbidez depende de los sólidos en suspensión. En la fabricación del jugo, los exprimidores industriales incorporan gran cantidad de pulpa. La pulpa en exceso se elimina de los jugos exprimidos mediante tamices y por centrifugación suave, hasta dejarla reducida a la proporción que exige el mercado; el contenido final de pulpa influye mucho sobre las propiedades del jugo, debido a que ésta por acción de la enzima pectinmetil esterasa puede precipitar, de allí la importancia de controlar este parámetro. El contenido de sólidos insolubles se determinó como resultado de la diferencia entre los sólidos totales en % (m/m) y los sólidos solubles % (m/m) obtenidos mediante el refractómetro de Abbé. Los sólidos totales se determinaron por desecación en la estufa con los debidos cuidados para evitar que el azúcar que contiene el jugo se caramelizara y por lo tanto fuera a dar un valor erróneo. En el Cuadro XXVIII se representan los valores obtenidos para los sólidos totales y para los sólidos insolubles. Dentro de las normas estudiadas no fue posible encontrar un valor recomendado para estos dos parámetros por lo que no fue posible compararlos estadísticamente. En la Figura 26, se muestra el diagrama de control para los sólidos totales. La media encontrada para los resultados de sólidos totales es de 13.84 % (m/m) con un intervalo de confianza de 12.67-15.03. Dentro de este intervalo de confianza cae el 46.6 % de las muestras de jugo de naranja. Por otro lado la media encontrada para los sólidos insolubles es de 1.25 con un intervalo de confianza de 0.51-1.99, dentro del cual se encuentra el 80 % de las muestras. Como se puede observar el jugo que menos contenido de sólidos insolubles es la muestra CN y la que contiene más sólidos insolubles es la muestra RND.

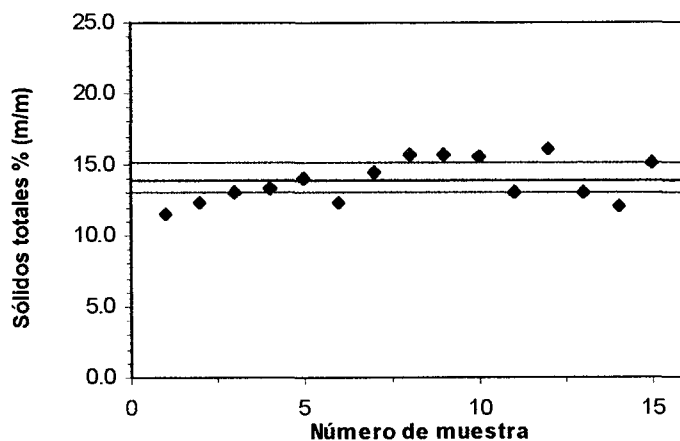


Figura 26. Diagrama del porcentaje de sólidos totales encontrados en los diferentes jugos de naranja.

Cuadro XXVIII. Contenido de sólidos totales, sólidos solubles y sólidos insolubles (% m/m) obtenidos para los jugos de naranja .

| | Código del jugo de naranja | % Sólidos totales (% m/m) | Sólidos solubles (% m/m) ± 0.5 | % Sólidos insolubles |
|----|-----------------------------------|----------------------------------|---------------------------------------|-----------------------------|
| 1 | AU | 11.48 ± 0.02 | 10.9 | 0.5 ± 0.5 |
| 2 | HO | 12.39 ± 0.03 | 10.6 | 1.8 ± 0.5 |
| 3 | MN | 13.08 ± 0.07 | 9.2 | 3.8 ± 0.5 |
| 4 | SF | 13.3 ± 0.2 | 12.7 | 0.6 ± 0.5 |
| 5 | OJ | 14.05 ± 0.04 | 13.1 | 0.9 ± 0.5 |
| 6 | JND | 12.33 ± 0.04 | 11.0 | 1.4 ± 0.5 |
| 7 | NDC | 14.47 ± 0.08 | 14.0 | 0.4 ± 0.5 |
| 8 | BO | 15.74 ± 0.08 | 15.4 | 0.4 ± 0.5 |
| 9 | BCV | 15.76 ± 0.02 | 14.6 | 1.1 ± 0.5 |
| 10 | JB | 15.604 ± 0.002 | 14.5 | 1.1 ± 0.5 |
| 11 | VA | 13.068 ± 0.004 | 12.2 | 0.8 ± 0.5 |
| 12 | RND | 16.087 ± 0.004 | 13.6 | 2.5 ± 0.5 |
| 13 | LF | 13.09 ± 0.06 | 12.0 | 1.1 ± 0.5 |
| 14 | CN | 12.1 ± 0.1 | 12.3 | 0.2 ± 0.5 |
| 15 | RDB | 15.2 ± 0.5 | 13.1 | 2.1 ± 0.7 |

Dentro de los sólidos solubles se encuentra la vitamina C, la cual fue determinada mediante el método de HPLC, y los resultados se expresan en el Cuadro XXIX. Como se puede apreciar en el cuadro los resultados varían de un jugo a otro. En la Figura 27 se muestra el diagrama de control para la concentración de vitamina C, la media encontrada para las 15 muestras es de 183.7 mg/kg con un intervalo de confianza de 104.8-262.6, dentro de este intervalo de confianza solamente el 33.3 % de las muestras cae dentro de él. Por otro lado el otro 33.3 % de las muestras no contiene vitamina C o no fue detectable mediante el método utilizado.

La norma ICAITI para jugo de naranja, ²⁵ reporta como valor mínimo de este compuesto, un valor igual a 350 mg/kg; este valor está representado por la línea azul. Como se puede observar solo una muestra (JND) se encuentra por encima de este valor, cumpliendo con la norma, la segunda muestra próxima a cumplir este valor es la NDC con un valor de 334 mg/kg.

Cuadro XXIX. Vitamina C obtenida para los diversos jugos de naranja.

| | Código del jugo de naranja | Vitamina C mg/L jugo | Vitamina C mg/kg |
|-----------|-----------------------------------|---------------------------------|-----------------------------|
| 1 | AU | 289 ± 15 | 277 ± 14 |
| 2 | HO | 288 ± 15 | 275 ± 14 |
| 3 | MN | 448± 15 | 427 ± 14 |
| 4 | SF | 164± 17 | 158 ± 16 |
| 5 | OJ | 125± 17 | 119 ± 16 |
| 6 | JND | 396± 15 | 381 ± 14 |
| 7 | NDC | 352 ± 15 | 334 ± 14 |
| 8 | BO | 264 ± 15 | 255 ± 14 |
| 9 | BCV | 182 ± 16 | 172 ± 15 |
| 10 | JB | 259± 15 | 245 ± 14 |
| 11 | VA | 53 ± 19 | 51 ± 18 |
| 12 | RND | no detectable | no detectable |
| 13 | LF | no detectable | no detectable |
| 14 | CN | 65 ± 19 | 62 ± 18 |
| 15 | RDB | no detectable | no detectable |

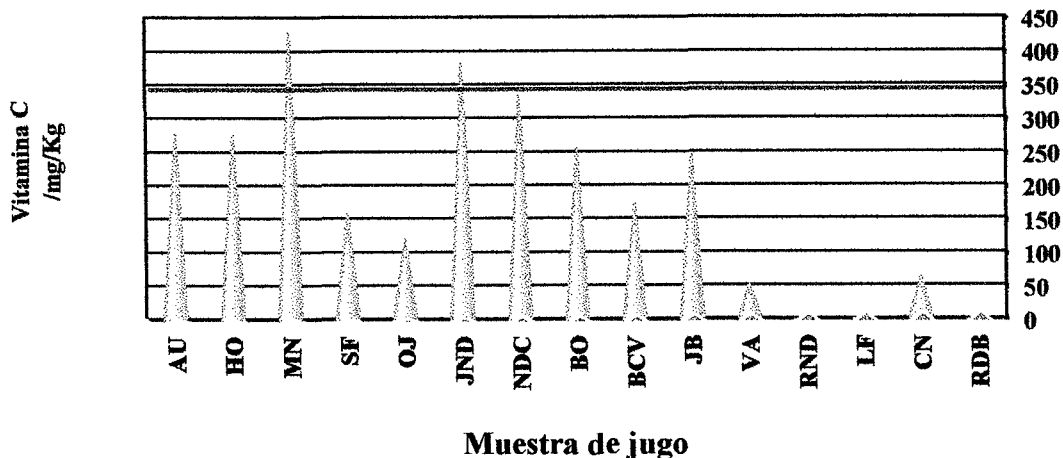


Figura 27. Diagrama de la concentración de vitamina C (encontrada mediante el método de HPLC) en los jugos de naranja.

Otro parámetro de calidad que se analizó fue el contenido de cenizas. La ceniza es el residuo inorgánico que permanece después de la combustión de la materia orgánica. A partir de las cenizas se pueden determinar los minerales que contiene el jugo así como ciertos metales tóxicos tales como el Pb, Cd y Hg. Según la participación de los distintos elementos en el contenido de las cenizas, se pueden dividir en macroelementos (Ca, P, K, Cl, Na, Mg) y microelementos (Fe, Zn, Cu, Mn, I, Mo).⁴⁷ La cantidad de ceniza es un parámetro de gran importancia para evaluar la calidad y grado de adulteración de un producto, por ejemplo la proporción de cenizas de Na, de K, de la suma Ca + Mg y del P, pueden servir como índices de adulteración, y también la proporción K/Na.³ Estos valores se determinan en el suero filtrado, ya que la proporción de pulpa influye mucho en ellos y se comparan con valores estadísticos típicos. En el cuadro XXX se muestran los resultados obtenidos para las cenizas en base seca. Como se puede apreciar en la Figura 28, la media encontrada para estos valores es de 2.36 con un intervalo de confianza de 1.2-3.52. En la literatura,⁴⁷ se reporta un intervalo para el contenido de ceniza en el jugo de naranja de 2.2 a 4.0, como se puede observar la media obtenida cae dentro de este intervalo.

Otro análisis que se llevó a cabo en el jugo de naranja fue la determinación de la densidad relativa, esta se determinó a 20 °C, los valores obtenidos se expresan en el Cuadro XXXI. En la Figura 29 se muestra el diagrama de control del número de muestra de jugo de naranja con respecto a la densidad relativa. La línea azul representa el valor mínimo recomendado por la norma ICAITI para jugo de naranja,²⁵ como se puede apreciar solo una muestra (SF) se encuentra por debajo de éste límite inferior permisible, a esta muestra se le aplicó una prueba de t de Student dando un t experimental igual a 62.63 y el t tabulado es igual a 63.60 a un nivel de significancia del 99 % para un grado de libertad, por lo que se acepta la hipótesis nula de que ambos valores no difieren significativamente. Como otro dato en el cuadro XXXI se expresan los resultados obtenidos del índice de refracción obtenido por el refractómetro de Abbé para cada una de las 15 muestras.

Cuadro XXX. Contenido de cenizas en% (m/m) en base seca, encontradas para los diferentes jugos de naranja.

| | Código del jugo de naranja | Cenizas |
|-----------|-----------------------------------|--------------------|
| 1 | AU | 3.25 ± 0.07 |
| 2 | HO | 4.2 ± 0.1 |
| 3 | MN | 3.2 ± 0.1 |
| 4 | SF | 4.06 ± 0.04 |
| 5 | OJ | 1.4 ± 0.1 |
| 6 | JND | 5.2 ± 0.1 |
| 7 | NDC | 3.5 ± 0.1 |
| 8 | BO | 2.5 ± 0.3 |
| 9 | BCV | 1.42 ± 0.08 |
| 10 | JB | 2.3 ± 0.1 |
| 11 | VA | 1.8 ± 0.1 |
| 12 | RND | 0.4 ± 0.1 |
| 13 | LF | 0.7 ± 0.2 |
| 14 | CN | 1.4 ± 0.2 |
| 15 | RDB | 0.11 ± 0.07 |

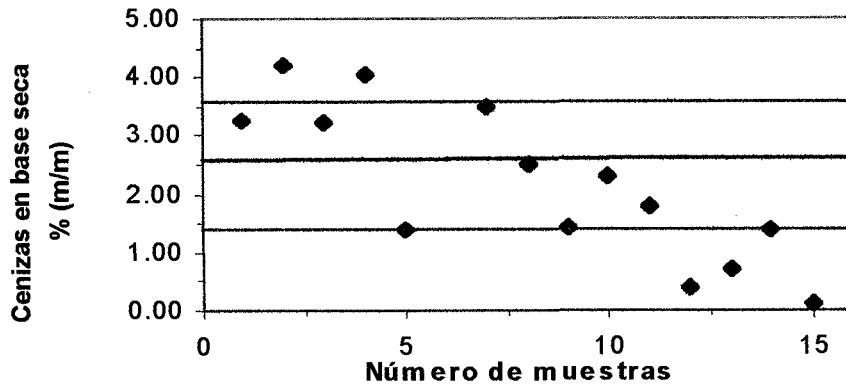


Figura 28. Diagrama del porcentaje de ceniza en base seca encontrado para los diferentes jugos de naranja.

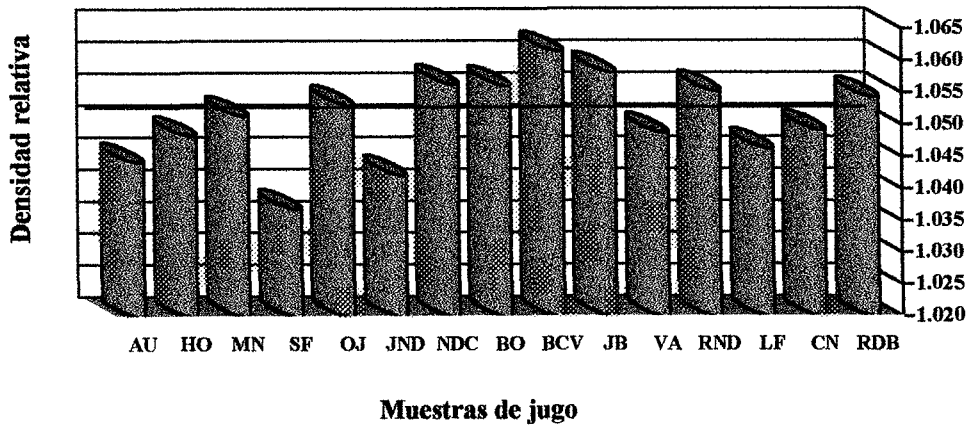


Figura 29. Diagrama de los valores de densidad para las muestras de jugo de naranja analizadas

Cuadro XXXI. Constantes físicas y químicas obtenidas para los jugos de naranja analizados.

| | Código del jugo de naranja | Densidad relativa $\rho_{20}^{20} \pm 0.0001$ | Indice de refracción $n_D (\pm 0.0001)$ $T \pm 0.5 \text{ } ^\circ\text{C}$ |
|-----------|-----------------------------------|---|--|
| 1 | AU | 1.0442 | 1.3496^{18.0} |
| 2 | HO | 1.0483 | 1.3492^{18.0} |
| 3 | MN | 1.0514 | 1.3472^{18.0} |
| 4 | SF | 1.0369 | 1.3520^{17.8} |
| 5 | OJ | 1.0531 | 1.3530^{17.8} |
| 6 | JND | 1.0422 | 1.3496^{17.5} |
| 7 | NDC | 1.0563 | 1.3545^{17.5} |
| 8 | BO | 1.0561 | 1.3564^{17.8} |
| 9 | BCV | 1.0615 | 1.3555^{17.5} |
| 10 | JB | 1.0582 | 1.3552^{17.8} |
| 11 | VA | 1.0487 | 1.3516^{18.0} |
| 12 | RND | 1.0553 | 1.3537^{17.5} |
| 13 | LF | 1.0463 | 1.3511^{17.8} |
| 14 | CN | 1.0491 | 1.3518^{17.8} |
| 15 | RDB | 1.0543 | 1.3530^{17.5} |

El color amarillo o anaranjado del jugo se debe a los carotenoides que están localizados como cromoplastos.³ El color rojo de las naranjas sanguinas se debe a los antocianinas, además de los carotenoides. La composición de la fracción de carotenoides de los cítricos es muy compleja, en principio pueden dividirse en tres grupos:

1. hidrocarburos (carotenos principalmente β -caroteno).
2. alcoholes y epóxidos.
3. ésteres.

Se puede determinar si un jugo ha sido adulterado por la adición de β -caroteno, por el cambio de la relación de carotenos a carotenoides oxigenados, que se hace mayor del 15 %, y que se determina por elución, de una columna de alúmina, con éter de petróleo y metanol, respectivamente.³

La adición de materias colorantes también está controlada y se tiene una lista de los compuestos que se pueden utilizar. Los más comunes son los colorantes derivados del alquitrán de carbón soluble en agua; estos colorantes pueden ser determinados por cromatografía de papel o de capa fina, el fundamento de este método consiste en que todos los colorantes autorizados solubles en agua, tienen carácter ácido y colorean la lana en disolución ácida. El color se obtiene primeramente en disolución ácida, se hierve con lana y se purifica. La disolución concentrada se emplea para ensayos cromatográficos, espectrofotométricos o químicos. En la Figura 30 se muestra uno de los cromatogramas obtenidos en papel Whatman N°1. En el centro de este cromatograma se observa el estándar, el cual está compuesto de una mezcla de colorantes sintéticos permitidos y de los más corrientemente utilizados en la industria alimentaria.⁴⁸ En el cuadro XXXII se muestran los resultados obtenidos para los jugos de naranja analizados en cuanto a los colorantes presentes en ellos y los Rf encontrados.⁴⁹ Como se puede apreciar solo tres de las muestras presentan colorantes (CN, LF, y RDB) estos son refrescos de naranja, creados a partir de jugo concentrado con aditivos y edulcorantes.

En las muestras LF y CN se encuentran presentes los colorantes Tartrazina y Amarillo Ocaso, por otro lado en la muestra RDB además de estos dos colorantes se encuentra presente el colorante Rojo N°40. Se puede ver que todos poseen un Rf muy parecido al del estándar.

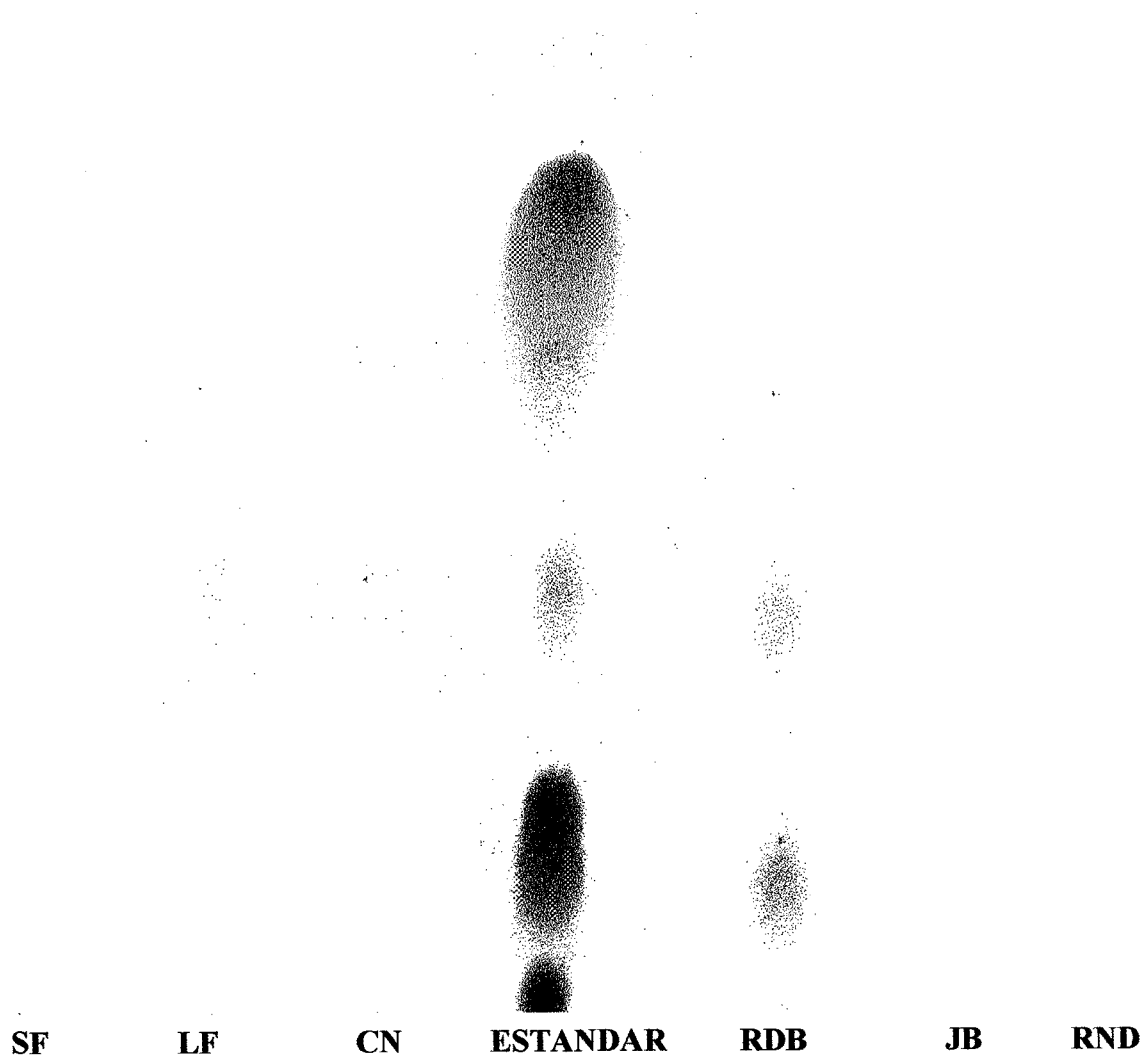


Figura 30. Cromatograma en papel Whatman N°1 obtenido para seis muestras de jugo de naranja junto con el estándar.

Disolvente de elución: 2 g de citrato de sodio + 85 mL NH_3 + 15 mL agua.

Cuadro XXXII. Colorantes encontrados en los jugos de naranja analizados y su respectivo Rf.

| | Código del jugo de naranja | Azul brillante | Tartrazina | Amarillo ocaso | Rojo N°40 | Eritrosina |
|-----------|-----------------------------------|-----------------------|-------------------|-----------------------|------------------|-------------------|
| | Estándar | 0.92 | 0.71 | 0.53 | 0.26 | 0.07 |
| 1 | AU | - | - | - | - | - |
| 2 | HO | - | - | - | - | - |
| 3 | MN | - | - | - | - | - |
| 4 | SF | - | - | - | - | - |
| 5 | OJ | - | - | - | - | - |
| 6 | JND | - | - | - | - | - |
| 7 | NDC | - | - | - | - | - |
| 8 | BO | - | - | - | - | - |
| 9 | BCV | - | - | - | - | - |
| 10 | JB | | | | | |
| 11 | VA | - | - | - | - | - |
| 12 | RND | - | - | - | - | - |
| 13 | LF | - | 0.70 | 0.51 | - | - |
| 14 | CN | - | 0.73 | 0.51 | - | - |
| 15 | RDB | - | 0.70 | 0.50 | 0.20 | - |

3.4 Propuesta parcial de norma.

Con los resultados obtenidos en los análisis llevados a cabo en los jugos de naranja, se elaboró una propuesta parcial de norma nacional para jugos de naranja, la cual será enviada a la ONNUM para que sea evaluada y discutida por funcionarios especializados en dicha materia y de esta forma se establezca un reglamento técnico con el sector productivo de jugos de naranja.

Jugos de naranja natural y pasteurizado

Propuesta parcial de Norma

1. Objetivo

Esta norma tiene por objeto establecer las especificaciones y características mínimas de calidad que deben cumplir los jugos de naranja.

2. Definición

Jugo de naranja. Jugo sin fermentar, pero fermentable, destinado al consumo directo, obtenido por procedimiento mecánico del endocarpio de naranjas (Citrus sinensis), maduras y en buen estado, conservado por medios físicos exclusivamente. El jugo podrá haber sido concentrado y luego reconstituido con agua para conservar los factores esenciales de composición y calidad del jugo.

3. Campo de aplicación

Esta norma se aplica a todos los jugos comercializados en el país.

4. Normas a consultar

-Instituto Centroamericano de Investigación y Tecnología Industrial (ICAITI) 34 001
Jugos de frutas

-Instituto Centroamericano de Investigación y Tecnología Industrial (ICAITI) 34 003
Métodos de ensayo para jugos y néctares de frutas.

-Instituto Centroamericano de Investigación y Tecnología Industrial (ICAITI) 34 008
Jugo de naranja.

-Instituto Centroamericano de Investigación y Tecnología Industrial (ICAITI) 34 148
Aditivos Alimentarios para el consumo humano.

5. Clasificación

El jugo de naranja se clasificará, de acuerdo con sus características, en la siguiente manera:

- a) Jugo de naranja natural.
- b) Jugo de naranja tratado térmicamente (UHT y pasteurizado).
- c) Jugo de naranja conservado por medios químicos.

6. Características físicas y químicas

El jugo de naranja deberá cumplir con los requisitos especificados en la tabla 1

Tabla 1

| Características físicas y químicas | jugo de naranja natural | jugo de naranja pasteurizado | jugo de naranja conservado por medios químicos |
|---|-------------------------|------------------------------|--|
| Densidad relativa a 20°C/20°C | 1.0480 | 1.0507 | 1.0522 |
| Acidez titulable: | | | |
| a) Expresada en % ácido cítrico anhidro | 0.75 | 0.70 | 0.60 |
| b) Expresada en meq de ácido cítrico/L | 116.8 | 107.2 | 939.9 |
| Sólidos solubles por lectura refractométrica a 20°C (°Brix) | 10.6 | 13.4 | 13.2 |
| Relación entre el contenido de sólidos solubles en °Brix, y acidez titulable, en ácido cítrico anhidro. | 16.0 | 19.8 | 22.3 |
| Sólidos insolubles (%) | 2.0 | 0.8 | 1.2 |
| Sólidos totales (%) | 12.3 | 14.1 | 14.2 |
| Contenido vitamina C (ppm) | 326.3 | 210 | 76.8 |
| Cenizas en base seca (%) | 3.6 | 2.8 | 1.2 |
| pH | 3.48 | 3.38 | 3.00 |
| Colorantes artificiales permitidos | no permitidos | no permitidos | permitidos |
| Azúcares totales (%) | 8.7 | 11.4 | 11.8 |

7. Requisitos microbiológicos.

7.1 Deberá estar exento de microorganismos que pueden desarrollarse en condiciones normales de almacenamiento, para esto se le deberá hacer:

- Recuento bacteriano total.
- Número más probable para coliformes totales.
- Número más probable para coliformes fecales debe ser menor de 3 por mL de muestra.

7.2 Deberá estar exento de toda sustancia originada por microorganismos en cantidad que pueda representar un riesgo para la salud.

7.3 La elaboración de los jugos de naranja debe llevarse a cabo bajo estrictas condiciones higiénico sanitarias.

8. Ingredientes Facultativos.

Cuando el jugo haya sido reconstituido, se permitirá la adición de colorantes naturales y artificiales, aroma y sabor, así como compuestos volátiles naturales del jugo de naranja; con el fin de conservar la composición esencial y los factores de calidad del jugo.

Los aditivos alimentarios deben cumplir con los requisitos establecidos por Codex alimentarius o el Ministerio de Salud.

8.1 Edulcorantes. No se permitirá el uso de edulcorantes sintéticos o artificiales para ajustar los sólidos solubles.

8.2 Acidificante. Se permite la adición de ácido cítrico para ajustar la acidez titulable.

8.3 Colorantes sintéticos. Se permite la adición de colorantes artificiales autorizados para jugos de naranja conservados por medios químicos.

8.4 Sustancias conservadoras. Se permite la adición de ácido benzoico en concentraciones de 0.01 %.

9. Contenido Neto.

La verificación del contenido será realizada de acuerdo a lo que establece el Decreto N. 26480 del 2 de diciembre de 1997, publicado en la Gaceta N. 232 Metrología. Contenido neto de producto preempacado y sus modificaciones.

10. Métodos de ensayo.

La determinación de las características especificadas en la tabla 1, se efectuaron de acuerdo a los siguientes métodos recomendados:

10.1 Métodos propuestos

10.1.1 **Determinación de vitamina C.** Se determina mediante cromatografía líquida de alta resolución con una columna C18 y con detector ultravioleta a una longitud de onda de 244 nm, utilizando como fase móvil una disolución de Na_2HPO_4 (0.1 mol/L) a un pH 2.14, regulado con H_3PO_4 y a un flujo de 0.7 mL/min. Se utiliza como agente estabilizante una disolución de EDTA al 0.05% (m/v).

10.1.2 **Determinación de azúcares (glucosa, fructosa y sacarosa).** Se determina mediante cromatografía líquida de alta resolución con una columna Econosphaera NH_2 de dimensiones 250 mm * 4.6 mm y tamaño de partícula de 5 μm con detector de índice de refracción en un rango de $16 \text{ E}-6$ RIU a temperatura ambiente, utilizando como fase móvil acetonitrilo: agua en una relación 80:20 a un flujo de 2.0 mL/min.

10.2 Modificaciones realizadas a los métodos de ensayo de la Norma ICAITI 34003.

10.2.1 **Acidez total.** Se calcula mediante una valoración potenciométrica con una disolución de NaOH 0.1000 mol/L; para esto se toma una alícuota de 20.0 mL del jugo de naranja filtrada a través de algodón.

10.2.2 **Sólidos solubles.** Se determina midiendo el índice de refracción de los jugos de naranja; para este propósito se debe realizar una curva de calibración de índice de refracción contra concentración de sacarosa con patrones de 0 a 50 % de sacarosa. Luego por interpolación de la recta de mejor ajuste, se obtiene el porcentaje de sólidos solubles y los grados Brix se obtienen de la lectura del refractómetro.

10.2.3 **Determinación cualitativa de colorantes.** Se realiza mediante cromatografía en papel. Para este fin se debe realizar primero la extracción de los colorantes en medio ácido con un trozo de lana natural. Posteriormente se lava este trozo de lana con agua y jabón. Luego se coloca en medio básico y se calienta hasta que se lleve a cabo la evaporación completa. Luego con un capilar se siembra en un papel de filtro Whatman No. 1 de 32 cm, y se coloca en una cámara de elución, utilizando como fase móvil una mezcla de 2g de citrato de sodio + 85 mL de NH_3 + 15 mL de H_2O . Finalmente se comparan los R_f de los colorantes con los estipulados en la literatura.

11. Envase y Rótulo.

- 11.1 Envases. Debe ser de un material aséptico y que no reaccione con el producto.
- 11.2 Rótulo o etiqueta. Los rótulos o etiquetas deben cumplir con lo que establece el Decreto No.26012 del 14 de mayo de 1997 publicado en la Gaceta No. 91: "Etiquetado de los productos alimentarios y sus modificaciones".

12. Para llevar a cabo la elaboración de dicha norma, se tomaron en cuenta las siguiente normas internacionales.

- 12.1 Instituto Centroamericano de Investigación y Tecnología Industrial. ICAITI; **Norma 34 215:93; Bebidas no carbonatadas**; Guatemala, 1993.
- 12.2 Instituto Centroamericano de Investigación y Tecnología Industrial. ICAITI; **Norma 34 008: Jugo de naranja**; Guatemala, 1993.
- 12.3 De Whalley, H. **Métodos ICUMSA de análisis de azúcar**, 1ra ed; Continental S.A: México, 1971, p. 63-64.
- 12.4 Official Methods of Analysis, AOAC, 15 ed; Association of Official Analytical Chemist: Washington, D.C., 1990, p. 915-1002.
- 12.5 Codex Alimentarius. **CODEX STAN 45-1981**. Norma del Codex para el Jugo de naranja conservado por medios físicos exclusivamente.
- 12.6 Datos de análisis de laboratorio físicos y químicos obtenidos.

4.0 Conclusiones y Recomendaciones.

4.1 Conclusiones

Se desarrolló una metodología para el análisis de vitamina C, glucosa, fructosa y sacarosa por la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en jugos de naranja naturales concentrados diluïdos. En el caso de la vitamina C se utilizó una columna C18 con detector UV-Vis y para el caso de los azúcares se utilizó una columna de exclusión iónica con detector de índice de refracción.

Se determinó que tanto el método de HPLC para vitamina C como para los tres azúcares son selectivos, pues son capaces de separar cada uno de los picos de interés con buena simetría. En el caso de vitamina C la resolución es de 3.73 y el pico presenta una simetría de 1.0. Por otro lado, la resolución entre la glucosa y fructosa es de 1.08 y entre la glucosa y sacarosa es de 3.8 con simetrías de 1.0, 1.03 y 1.03 respectivamente.

Una de las ventajas que presenta la cromatografía líquida de alta resolución con respecto al método oficial de Lane y Eynon, es que se pueden cuantificar de forma independiente la glucosa, fructosa y sacarosa, aunque estén en pequeñas cantidades en las muestras.

Se determinó que el EDTA, el pH bajo y una fuerza iónica alta de KH_2PO_4 (0.1 M), así como el mantener las disoluciones a temperaturas bajas y protegidas de la luz, evitan por más de 24 horas la oxidación de la vitamina C en cantidades significativas.

La metodología de HPLC para determinar azúcares, presenta la ventaja de que a la muestra no se le necesita realizar ningún tipo de tratamiento especial, además se requiere de muy poca cantidad de muestra y el tiempo de análisis es relativamente corto. En el caso de la vitamina C, la muestra tampoco requiere de ningún tipo de tratamiento previo, sin embargo si hay que tomar ciertos cuidados para evitar que ésta, se oxide a ácido dehidroascórbico. Por otro lado el tiempo de análisis es relativamente corto.

Ambos métodos presentan la desventaja de que el equipo de HPLC es muy caro, además utiliza equipo y reactivos (filtros y solventes de alta pureza) que son muy caros.

Otra desventaja que presenta el método de vitamina C por HPLC, es que al utilizar una disolución amortiguadora de fosfatos requiere de mucha limpieza, pues si quedan sales dentro de la columna, pueden llegar a precipitar y dañarla.

La precisión obtenida para el método de HPLC tanto para determinar vitamina C como para determinar azúcares, resultó ser buena; pues presentan un D.S.R de 1.62 para la vitamina C y de 2.0, 1.9 y de 1.3 para la glucosa, fructosa y sacarosa, siendo estos valores aceptados por la AOAC y por la USP.

Tanto la técnica de HPLC para vitamina C como para los tres azúcares, presentan un amplio rango de linealidad; sin embargo por medio del criterio de Taylor, se pudo establecer un ámbito de trabajo, en el cual se podría utilizar para cuantificar el programa de mínimos cuadrados simples.

La exactitud de ambos métodos fue buena, pues se compararon los resultados obtenidos por estas dos técnicas con los métodos oficiales para determinar vitamina C, glucosa, fructosa y sacarosa y no se encontró diferencia significativa a un nivel de confianza del 95%.

Se determinó la veracidad del método de vitamina C y el de los tres azúcares, obteniéndose porcentajes de recuperación del 93.1% para la vitamina C y 94.9, 94.7 y de 94.6 para la glucosa, fructosa y sacarosa respectivamente.

De las 15 muestras analizadas de jugo de naranja, solo una de ellas cumple con la cantidad de vitamina C requerida en la norma ICAITI; las otras muestras se encuentran muy por debajo de este límite inferior permisible.

De los análisis de pH y acidez total, se puede deducir que la mayoría de jugos de naranja, se encuentra por debajo del límite permisible dado por la norma BSEN y la norma ICAITI.

De las 15 muestras analizadas para la determinación de los sólidos solubles (°Brix), sólo una de ellas (MN) se encuentra por debajo del límite permisible dado por la norma ICAITI.

Se puede concluir que de las 15 muestras analizadas, el 80% de los sólidos solubles lo constituyen los azúcares (glucosa, fructosa y sacarosa).

4.2 Recomendaciones.

Para la determinación de vitamina C se recomienda mantener las muestras en refrigeración y protegidas de la luz, de esta forma se retarda la oxidación de la vitamina C a ácido dehidroascórbico.

Se recomienda mantener el pH a 2.14 de la disolución amortiguadora de fosfatos con el fin de obtener una buena separación de los picos de EDTA y del ácido ascórbico.

Para la determinación de la acidez total se recomienda utilizar una titulación potenciométrica con una disolución valorada de NaOH.

Por último, se recomienda realizar un control microbiológico exhaustivo de los jugos de naranja, para una normativa final.

5.0 Bibliografía

- 1- Órgano Oficial de la Cámara Costarricense de la Industria Alimentaria. **Alimentaria**; 1970, 10, 8-9.
- 2- Pérez R., O. **Frutas: Jugos que dan vida**; Naturismo Centroamericano: 7, p. 31-32.
- 3- Primo Y., E. **Química Agrícola**; Alhambra: Madrid, 1982, p. 373-439.
- 4- Instituto Centroamericano de Investigación y Tecnología Industrial, ICAITI. **Norma 34008. Jugo de Naranja**; Guatemala, 1986.
- 5- Iranzo R, J.; *Agroquímica y Tecnología de Alimentos*. 1965, 5(2), 141-142.
- 6- Departamento de Industrias Alimentarias. *Tecnología de Alimentos*. 1980, 15, 18-20.
- 7- Fundación para la investigación agroindustrial alimentaria. *Mercadeo Alimentaria*. 1994, 5(2), 4.
- 8- Comisión del Codex Alimentarius. Métodos FAO/OMS. **Codex alimentarius para el análisis de azúcares**; Roma, 1969, p. 5-8.
- 9- De Whalley, H. **Métodos ICUMSA de análisis de azúcar**, 1ra ed; Continental S.A: México, 1971, p. 63-64.
- 10- Instituto Centroamericano de Investigación y Tecnología Industrial. ICAITI; **Norma 34 003 h9: Productos elaborados a partir de frutas y hortalizas. Determinación de los sólidos totales**; Guatemala, 1993.
- 11- Official Methods of Analysis, AOAC, 15 ed; Association of Official Analytical Chemist: Washington, D.C., 1990, p. 915-1002.
- 12- Instituto Centroamericano de Investigación y Tecnología Industrial. ICAITI; **Norma 34 003 h30: Productos elaborados a partir de frutas y hortalizas. Determinación de cenizas en base seca**; Guatemala, 1993.
- 13- Codex Alimentarius. **Métodos de Análisis y Muestreo**; 1992, 6, 109.
- 14- Instituto Centroamericano de Investigación y Tecnología Industrial. ICAITI; **Norma 34 003 h10: Productos elaborados a partir de frutas y hortalizas. Determinación de los sólidos solubles**; Guatemala, 1993.

- 15- Instituto Centroamericano de Investigación y Tecnología Industrial. ICAITI; **Norma 34 003 h14: Productos elaborados a partir de frutas y hortalizas. Determinación de la acidez**; Guatemala, 1993.
- 16- Alli, I; Kermasha, S. *Journal of Food Science*. **1985**, 54(3), 674-675.
- 17- Meader, G. P. **Manual del azúcar de caña**. Montaner y Simón S. A.: Barcelona, 1967, p. 13, 27, 28, 510, 511, 515, 519-523, 531.
- 18- Iverson, J. *Assoc. Off. Anal. Chem.* **1981**, 64(1), 139-143.
- 19- Palmer, J. *Anal. Letters*. **1975**, 8(3), 215-224.
- 20- Roe H, J. **Methods of Biochemical Analysis**; Interscience: New York, **1954**, 1, 118-121.
- 21- Goodney, D. *Journal of Chemical Education*. **1987**, 64(2), p.187-188.
- 22- Instituto Centroamericano de Investigación y Tecnología Industrial. ICAITI; **Norma 34 003 h5: Productos elaborados a partir de frutas y hortalizas. Determinación de la densidad relativa**; Guatemala, 1975.
- 23- Organización Panamericana de la Salud / Organización Mundial de la Salud. **Normas Sanitarias de Alimentos**; Organización Mundial de la Salud: Centro América y Panamá, 1967, p. 27-28.
- 24- Instituto Centroamericano de Investigación y Tecnología Industrial. ICAITI; **Norma 34 215:93; Bebidas no carbonatadas**; Guatemala, 1993.
- 25- Instituto Centroamericano de Investigación y Tecnología Industrial. ICAITI; **Norma 34 008: Jugo de naranja**; Guatemala, 1993.
- 26- Smith, B. **Codex Alimentarius**; Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación: Roma, 1992, División 5.
- 27- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. **Normas internacionales recomendadas para los jugos de naranja, pomelo y limón conservadas por medios físicos exclusivamente**; Roma, 1971, p. 5-10.
- 28- Instituto Técnico costarricense. INTECO; **Norma 02-02-06-97: Norma general para el jugo de frutas. No regulados por normas individuales**; Costa Rica, 1997.

- 29- Instituto Técnico costarricense. INTECO; **Norma 02-04-01-97: Norma general para Bebidas no carbonatadas. No regulados por normas individuales**; Costa Rica, 1997.
- 30- Solórzano S, A. **Ley de promoción de la competencia y defensa efectiva del consumidor y su reglamento**; Investigaciones Jurídicas S. A., San José, 1997.
- 31- Ley No. 5292. Ministerio de Economía, Industria y Comercio. 1973.
- 32- Reglamento decreto No. 3896. Ministerio de Economía, Industria y Comercio. 1973.
- 33- Hubaux, A.; Vos, G. *Anal. Chem.* 1970, 42, 849..
- 34- Meir, P; Zünd, R. **Statistical Methods in Analytical Chemistry**; John Wiley & Sons: New York; 1993, 81-138.
- 35- Miller, J. C.; Miller, J. N. **Estadística para Química Analítica**; Addison-Wesley Iberoamericana: Delaware, 1993, p. 95-103.
- 36- Taylor, J. K. *Anal. Chem.* 1987, 55, 600A.
- 37- Lloyd L., L; Warner P., F. *Food Chemistry.* 1998, 28, 257-268.
- 38- Ashoor M., S.; Monte, W.; Welty, J. J. *Assoc. Off. Anal. Chem.* 1984, 67(1), 78-80.
- 39- Snyder, L.; Kirkland, J.; Glajch, J. **Practical HPLC method development**; John Wiley and Sons: New York, 1997, p. 71-76, 80, 208-210, 643-652.
- 40- Schosinsky G., J. **Optimización y validación de un método para análisis de plaguicidas organoclorados en agua potable y agua fluvial, en el nivel de ng/L.** Universidad de Costa Rica: San José, 1994, p. 149.
- 41- Taylor, J. **Quality assurance of Chemical measurements.** Lewis Publishers, Michigan, 1987, pp: 39, 78-82, 193,273.
- 42- Caulcutt, R.; Boddy, R. **Statistics for Analytical Chemists**; Chapman and Hall: New York, 1983, p. 70-71, 73-77, 140-142, 156-159, 180-183, 185-194.
- 43- Quattrocchi, O.; Abelaira, S.; Laba, R. **Introducción a la HPLC, Aplicación y Práctica**, 1^{ra} ed; Artes Gráficas Farro: Buenos Aires, 1992, Cap I.
- 44- Frazler, W.C; Westhof, D.C. **Microbiología de los Alimentos.** 3^{ra} ed; Acribia, S.A: España, 1985, p. 4-5, 198-210.
- 45- British Standard BSEN. Método para la determinación del valor de pH en jugos de frutas y jugos vegetales

- 46- Badui Dergal, S. **Química de los Alimentos**. 1^{ra} ed; Alhambra mexicana, S.A: México, 1981, p.317.
- 47- Belitz, Hans-Dieter; Grosh, Werner. **Química de los Alimentos**; 2^{da} ed; Acribia, S.A: España, 1988, p.341-673.
- 48- Rivera R, Maritza. **Caracterización Físicoquímica de Siropes Comerciales Preparados a Base de Sacarosa**. Universidad de Costa Rica, San José, 1999.
- 49- Instituto Centroamericano de Investigación y Tecnología Industrial. **Norma 34 148. Aditivos Alimentarios. Colorantes artificiales**. 1984.

6.0 Apéndice.

A-1. Estudio de la resolución a diferentes flujos, de los picos del EDTA y del ácido ascórbico.

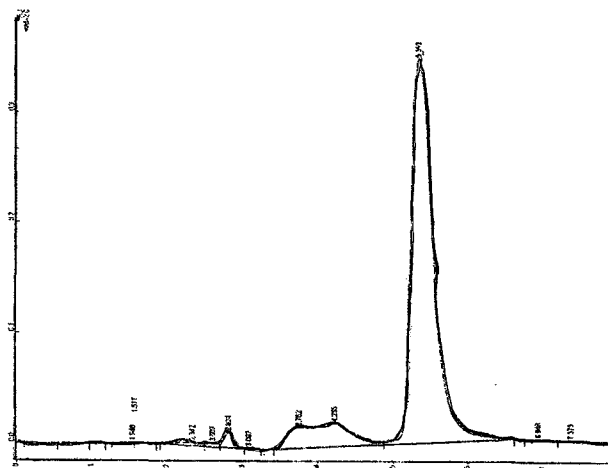


Figura 31. Resolución a 0.5 mL/ min

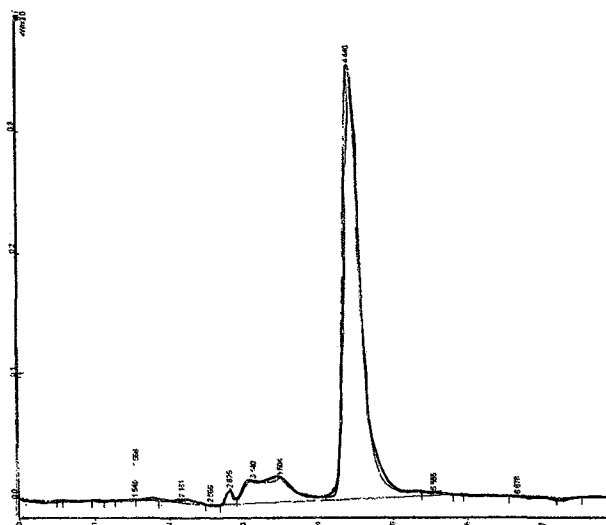


Figura 32. Resolución a 0.6 mL/min.

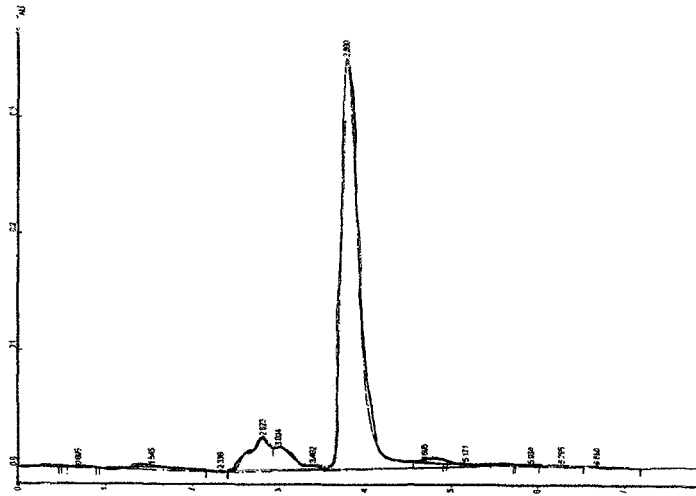


Figura 33. Resolución a 0.7 mL/min.

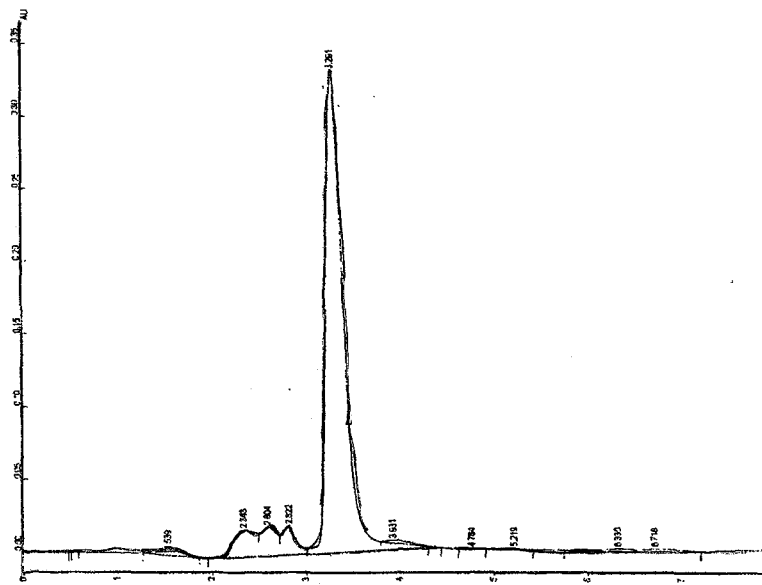


Figura 34. Resolución a 0.8 mL/min.

A-2. Resultados obtenidos para la obtención de las curvas de Taylor

Cuadro A-2.1 Datos obtenidos para la obtención de la curva de Taylor para la vitamina C.

| | Vitamina C/ mgL ⁻¹ | Area/u.a. |
|----------|-------------------------------|-----------|
| | 20.04 | 547027 |
| | 20.04 | 548220 |
| | 20.04 | 545509 |
| | 20.04 | 551541 |
| | 20.04 | 550999 |
| | 20.04 | 549095 |
| | 20.04 | 550856 |
| Promedio | | |
| S | | |

| | | |
|----------|-------|---------|
| | 40.04 | 1024388 |
| | 40.04 | 1039430 |
| | 40.04 | 1037275 |
| | 40.04 | 1035982 |
| | 40.04 | 1045963 |
| | 40.04 | 1033918 |
| | 40.04 | 1030374 |
| Promedio | | |
| S | | |

| | | |
|----------|-------|---------|
| | 100.8 | 2430821 |
| | 100.8 | 2410708 |
| | 100.8 | 2425567 |
| | 100.8 | 2425194 |
| | 100.8 | 2414863 |
| | 100.8 | 2414223 |
| | 100.8 | 2421332 |
| Promedio | | |
| S | | |

Cuadro A-2.2 Datos obtenidos para la obtención de la curva de Taylor para la glucosa.

| | glucosa % (m/v) | Area/u.a. |
|----------|-----------------|-----------|
| | 0.0801 | 326754 |
| | 0.0801 | 343876 |
| | 0.0801 | 333311 |
| | 0.0801 | 340595 |
| | 0.0801 | 331080 |
| | 0.0801 | 328520 |
| | 0.0801 | 338587 |
| Promedio | - | 338587 |
| S | - | 6460 |

| | | |
|----------|-------|---------|
| | 0.400 | 1661204 |
| | 0.400 | 1647422 |
| | 0.400 | 1649588 |
| | 0.400 | 1658190 |
| | 0.400 | 1673290 |
| | 0.400 | 1656974 |
| | 0.400 | 1658896 |
| Promedio | - | 1657938 |
| S | - | 8452 |

| | | |
|----------|-----|---------|
| | 1.2 | 4953401 |
| | 1.2 | 4945163 |
| | 1.2 | 4957878 |
| | 1.2 | 4961621 |
| | 1.2 | 4986337 |
| | 1.2 | 4976549 |
| | 1.2 | 4974023 |
| Promedio | - | 4964996 |
| S | - | 15265 |

Cuadro A-2.3 Datos obtenidos para la obtención de la curva de Taylor para la fructosa.

| | fructosa % (m/v) | Area/u. a. |
|----------|------------------|------------|
| | 0.0804 | 306908 |
| | 0.0804 | 308610 |
| | 0.0804 | 306753 |
| | 0.0804 | 308625 |
| | 0.0804 | 300680 |
| | 0.0804 | 301188 |
| | 0.0804 | 301299 |
| Promedio | - | 304866 |
| S | - | 3644 |

| | | |
|----------|-------|---------|
| | 0.402 | 1524991 |
| | 0.402 | 1510794 |
| | 0.402 | 1528518 |
| | 0.402 | 1516132 |
| | 0.402 | 1533776 |
| | 0.402 | 1523530 |
| | 0.402 | 1522911 |
| Promedio | - | 1522950 |
| S | - | 7604 |

| | | |
|----------|------|---------|
| | 1.21 | 4610788 |
| | 1.21 | 4621952 |
| | 1.21 | 4628811 |
| | 1.21 | 4621491 |
| | 1.21 | 4634589 |
| | 1.21 | 4647785 |
| | 1.21 | 4628546 |
| Promedio | - | 4627709 |
| S | - | 11622 |

Cuadro A-2.4 Datos obtenidos para la obtención de la curva de Taylor para la sacarosa.

| | sacarosa % (m/v) | Area/u.a. |
|----------|------------------|-----------|
| | 0.0802 | 297888 |
| | 0.0802 | 309269 |
| | 0.0802 | 302222 |
| | 0.0802 | 308598 |
| | 0.0802 | 296758 |
| | 0.0802 | 308827 |
| | 0.0802 | 307605 |
| Promedio | - | 304452 |
| S | - | 5427 |

| | | |
|----------|-------|---------|
| | 0.400 | 1606410 |
| | 0.400 | 1591587 |
| | 0.400 | 1600934 |
| | 0.400 | 1584256 |
| | 0.400 | 1602264 |
| | 0.400 | 1594945 |
| | 0.400 | 1606492 |
| Promedio | - | 1598127 |
| S | - | 8255 |

| | | |
|----------|-------|---------|
| | 1.201 | 4843380 |
| | 1.201 | 4873702 |
| | 1.201 | 4861768 |
| | 1.201 | 4847104 |
| | 1.201 | 4849778 |
| | 1.201 | 4874337 |
| | 1.201 | 4843060 |
| Promedio | - | 4856161 |
| S | - | 13707 |

A-3. Datos de análisis para determinar la precisión del método de vitamina C, glucosa, fructosa y sacarosa.

| | Vitamina C/mg/L | Area/u.a |
|-----------------|------------------------|-----------------|
| | 32.8 | 854600 |
| | 32.8 | 854919 |
| | 33.4 | 868619 |
| | 32.1 | 837331 |
| | 33.5 | 871425 |
| | 33.5 | 870002 |
| | 33.4 | 866901 |
| Promedio | 33.1 | 860542 |
| S | 0.5 | 12378 |

| | glucosa % (m/v) | Area/u.a |
|-----------------|------------------------|-----------------|
| | 0.097 | 407175 |
| | 0.099 | 411557 |
| | 0.094 | 394645 |
| | 0.097 | 404067 |
| | 0.100 | 416483 |
| | 0.101 | 420225 |
| | 0.100 | 417437 |
| Promedio | 0.098 | 410227 |
| S | 0.002 | 8971 |

| | fructosa/ % (m/v) | Area/u.a |
|-----------------|--------------------------|-----------------|
| | 0.101 | 395305 |
| | 0.101 | 395741 |
| | 0.098 | 383763 |
| | 0.099 | 385308 |
| | 0.099 | 386453 |
| | 0.104 | 406352 |
| | 0.101 | 394082 |
| Promedio | 0.100 | 392429 |
| S | 0.002 | 7930 |

| | sacarosa/ % (m/v) | Area/u.a |
|-----------------|--------------------------|-----------------|
| | 0.377 | 1484673 |
| | 0.377 | 1485585 |
| | 0.376 | 1479882 |
| | 0.373 | 1470274 |
| | 0.384 | 1513131 |
| | 0.387 | 1522696 |
| | 0.387 | 1523286 |
| Promedio | 0.380 | 1497075 |
| S | 0.005 | 21989 |

A-4 Muestra de cálculo para la determinación de los límites de detección y de cuantificación mediante el método de Miller y Miller.

Cuadro A-4.1. Muestra de cálculo para la determinación de los límites de detección y de cuantificación mediante el método de Miller y Miller para la vitamina C.

| X _i / (mg/L) | Y _i /ua | Intersección (a) | Pendiente (b) | ŷ _i | (y _i -ŷ _i) | (y _i -ŷ _i) ² | S _b =S _y /x | yLOD | LOD/ (mg/L) | LOQ/ (mg/L) |
|-------------------------|--------------------|------------------|---------------|----------------|-----------------------------------|--|-----------------------------------|--------|-------------|-------------|
| 20.04 | 549035 | 105700 | 22857 | 5.64E+05 | -1.47E+04 | 2.17E+08 | 14690.5 | 149772 | 1.93 | 6.43 |
| 40.04 | 1035333 | | | 1.02E+06 | 1.44E+04 | 2.08E+08 | | | | |
| 100.8 | 2420387 | | | 2.41E+06 | 1.07E+04 | 1.14E+08 | | | | |
| 130.8 | 3085013 | | | 3.10E+06 | -1.04E+04 | 1.08E+08 | | | | |
| | Promedio | | | | Sumatoria | 6.47E+08 | | | | |
| | 1772442 | | | | | | | | | |

Cuadro A-4.2. Muestra de cálculo para la determinación de los límites de detección y de cuantificación mediante el método de Miller y Miller para la fructosa.

| X _i / % (m/v) | Y _i / (u.a) | Intersección (b) | Pendiente (a) | ŷ _i | (y _i -ŷ _i) | (y _i -ŷ _i) ² | S _b =S _y /x | yLOD | LOD % (m/v) | LOQ % (m/v) |
|--------------------------|------------------------|------------------|---------------|----------------|-----------------------------------|--|-----------------------------------|-------|-------------|-------------|
| 0.02011 | 81764 | -681.90 | 3.82E+06 | 7.61E+04 | 5664.3 | 32084538.4 | 13168 | 38823 | 0.010 | 0.034 |
| 0.0804 | 304866 | | | 3.06E+05 | -1425.6 | 2032204.07 | | | | |
| 0.2413 | 913406 | | | 9.21E+05 | -7214.7 | 52051939.2 | | | | |
| 0.402 | 1522950 | | | 1.53E+06 | -11235.8 | 126243271 | | | | |
| 0.603 | 2295975 | | | 2.30E+06 | -5645.1 | 31867048.9 | | | | |
| 0.806 | 3099586 | | | 3.08E+06 | 22895.8 | 524215484 | | | | |
| 1.21 | 4629236 | | | 4.62E+06 | 10041.6 | 100833694 | | | | |
| 1.601 | 6098983 | | | 6.11E+06 | -13080.5 | 171100043 | | | | |
| | Promedio | | | | | | | | | |
| | 2368345.8 | | | | sumatoria | 1040428223 | | | | |

Cuadro A-4.3. Muestra de cálculo para la determinación de los límites de detección y de cuantificación mediante el método de Miller y Miller para la glucosa.

| X _i / % (m/v) | Y _i (u.a) | Intersección (b) | Pendiente (a) | ŷ _i | (y _i -ŷ _i) | (y _i -ŷ _i) ² | S _b =S _{y/x} | yLOD | LOD %(m/v) | LOQ %(m/v) |
|-----------------------------|----------------------|---------------------|------------------|----------------|-----------------------------------|--|----------------------------------|---------|---------------|---------------|
| 0.02001 | 80945 | 6429.7 | 4.14E+06 | 87725.8 | -6780.79258 | 45979148.1 | 14115.99 | 48777.7 | 0.010 | 0.0341 |
| 0.0801 | 334674.71 | | | 336318.5 | -1643.81758 | 2702136.24 | | | | |
| 0.2401 | 998121 | | | 998239.6 | -118.620608 | 14070.8486 | | | | |
| 0.4 | 1657937.7 | | | 1659747 | -1809.29895 | 3273562.7 | | | | |
| 0.6 | 2491012 | | | 2487148.4 | 3863.629764 | 14927635 | | | | |
| 0.8 | 3346675 | | | 3314549.7 | 32125.26848 | 1032032875 | | | | |
| 1.2 | 4963491.5 | | | 4969352.4 | -5860.95408 | 34350782.8 | | | | |
| 1.6 | 6616263 | | | 6624155.2 | -7892.17665 | 62286452.3 | | | | |
| | Promedio | | | | sumatoria | 1195566663 | | | | |
| | 2561140 | | | | | | | | | |

Cuadro A-4.4. Muestra de cálculo para la determinación de los límites de detección y de cuantificación mediante el método de Miller y Miller para la sacarosa.

| X _i / % (m/v) | Y _i /u.a | Intersección (b) | Pendiente (a) | ŷ _i | (y _i -ŷ _i) | (y _i -ŷ _i) ² | S _b =S _{y/x} | yLOD | LOD %(m/v) | LOQ %(m/v) |
|-----------------------------|---------------------|---------------------|------------------|----------------|-----------------------------------|--|----------------------------------|--------|---------------|---------------|
| 0.020 | 79666 | 343.214446 | 4.00E+06 | 84854.36 | -5188.36 | 26919042 | 35610.41 | 107174 | 0.027 | 0.089 |
| 0.080 | 304452.42 | | | 325383.7 | -20931.2 | 438117102 | | | | |
| 0.240 | 948527 | | | 963865.1 | -15338.1 | 235258116 | | | | |
| 0.400 | 1598126.9 | | | 1603146 | -5018.83 | 25188646 | | | | |
| 0.600 | 2394480 | | | 2402246 | -7766.39 | 60316751 | | | | |
| 0.801 | 3226166 | | | 3205343 | 20823.41 | 433614431 | | | | |
| 1.201 | 4858344.8 | | | 4803544 | 54800.84 | 3.003E+09 | | | | |
| 1.600 | 6339560 | | | 6397750 | -58189.9 | 3.386E+09 | | | | |
| | Promedio | | | | | | | | | |
| | 2468665.4 | | | | sumatoria | 7.609E+09 | | | | |

A-5 Muestra de cálculo para la determinación de los límites de detección y de cuantificación mediante el método Hubaux.

Cuadro A-5.1. Muestra de cálculo para la determinación de los límites de detección y de cuantificación mediante el método Hubaux para la fructosa.

| X_i %(m/v) | Y_i (u.a) | pendiente (a) | intersección (b) | $(X_i - X_{prom})(Y_i - Y_{iprom})$ | $(X_i - X_{prom})^2$ | Y_i | $(Y_i - Y_c)^2$ | Y_c | LOD %(m/v) | LOQ %(m/v) |
|--------------|-------------|---------------|------------------|-------------------------------------|----------------------|-----------|-----------------|--------|------------|------------|
| 0.08 | 306908 | 3822734.03 | -1818.757 | 461737.5077 | 0.12091 | 305529.06 | 1901477.2 | 4976.9 | 0.00178 | 0.0059 |
| 0.08 | 308610 | | | 461145.6797 | 0.12091 | 305529.06 | 9492195 | | | |
| 0.08 | 306753 | | | 461791.405 | 0.12091 | 305529.06 | 1498030 | | | |
| 0.08 | 308625 | | | 461140.4638 | 0.12091 | 305529.06 | 9584848 | | | |
| 0.08 | 300680 | | | 463903.139 | 0.12091 | 305529.06 | 23513377 | | | |
| 0.60 | 2295975 | | | 115624.858 | 0.03058 | 2303289.9 | 53507228 | | | |
| 1.21 | 4621952 | | | 2335587.875 | 0.61133 | 4623689.4 | 3018627 | | | |
| 1.21 | 4628811 | | | 2340950.756 | 0.61133 | 4623689.4 | 26230584 | | | |
| Promedio | Promedio | | | sumatoria | sumatoria | sumatoria | | | | |
| 0.43 | 1634789.3 | | | 7101881.684 | 1.8578016 | | 128746368 | | | |
| | | | | | | | Desv.Estand. | | | |
| | | | | | | | 2603.09904 | | | |

Cuadro A-5.2. Muestra de cálculo para la determinación de los límites de detección y de cuantificación mediante el método Hubaux para la glucosa.

| x_i %(m/v) | y_i | pendiente (a) | intersección (b) | $(X_i - X_{prom})(Y_i - Y_{iprom})$ | $(X_i - X_{prom})^2$ | Y_i | $(Y_i - Y_c)^2$ | Y_c | LOD %(m/v) | LOQ %(m/v) |
|--------------|----------|---------------|------------------|-------------------------------------|----------------------|-----------|-----------------|-------|------------|------------|
| 0.08 | 333311 | 4127536 | 4837.36 | 491912.0405 | 0.11900 | 335452.97 | 4588019 | 19433 | 0.0035 | 0.0118 |
| 0.08 | 340595 | | | 489399.3336 | 0.11900 | 335452.97 | 26440510 | | | |
| 0.08 | 331080 | | | 492681.6518 | 0.11900 | 335452.97 | 19122834 | | | |
| 0.08 | 328520 | | | 493564.7558 | 0.11900 | 335452.97 | 48066021 | | | |
| 0.08 | 338587 | | | 490092.0183 | 0.11900 | 335452.97 | 9822167 | | | |
| 0.60 | 2491012 | | | 128004.2179 | 0.03060 | 2481358.8 | 93184725 | | | |
| 1.20 | 4953401 | | | 2475230.194 | 0.60053 | 4957880.2 | 20063197 | | | |
| 1.20 | 4957878 | | | 2478699.589 | 0.60053 | 4957880.2 | 4.8225054 | | | |
| Promedio | Promedio | | | sumatoria | sumatoria | sumatoria | | | | |
| 0.43 | 1759298 | | | 7539583.8 | 1.826655 | | 221287481 | | | |
| | | | | | | | Desv.Estand. | | | |
| | | | | | | | 5622.4992 | | | |

Cuadro A-5.3. Muestra de cálculo para la determinación de los límites de detección y de cuantificación mediante el método Hubaux para la sacarosa.

| xi (%m/v) | yi | pendiente (a) | intercepción (b) | $(x_i - x_{prom})(y_i - y_{i_{prom}})$ | $(x_i - x_{prom})^2$ | Yi | $(y_i - Y_i)^2$ | yc | LOD %(m/v) | LOQ %(m/v) |
|-----------|------------|------------------|---------------------|--|----------------------|----------|-----------------|------|---------------|---------------|
| 0.00 | 0 | 4046234.35 | -15716.9452 | 57253 | 0.142968 | -15716.9 | 247022367 | 8942 | 0.00609 | 0.0203 |
| 0.0802 | 309269 | | | 358965 | 0.088751 | 308791 | 228436 | | | |
| 0.0802 | 302222 | | | 361064 | 0.088751 | 308791 | 43152417 | | | |
| 0.0802 | 308598 | | | 359165 | 0.088751 | 308791 | 37268 | | | |
| 0.0802 | 308827 | | | 359096 | 0.088751 | 308791 | 1292 | | | |
| 0.0802 | 307605 | | | 359460 | 0.088751 | 308791 | 1406714 | | | |
| 0.6 | 2394480 | | | 195322 | 0.049234 | 2412023 | 307780260 | | | |
| 1.201 | 4847104 | | | 2742602 | 0.677146 | 4843810 | 10847049 | | | |
| 1.201 | 4849778 | | | 2744802 | 0.677146 | 4843810 | 35610888 | | | |
| | | | | | | | | | | |
| Promedio | Promedio | | | sumatoria | sumatoria | | sumatoria | | | |
| 0.38 | 1514209.22 | | | 8053018 | 1.990250 | | 646086694 | | | |
| | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | Desv. Estand. | | | |
| | | | | | | | 9607 | | | |

A-6. Aplicación de la prueba de t de Student para los diferentes análisis realizadas a los jugos de naranja.

Cuadro A-6.1 Datos para la prueba de t de Student para los grados Brix.

| Muestra | media | valor | n | s | t exp | t tab |
|---------|-------|-------|---|-----|------------|-------|
| AU | 11.2 | 10 | 2 | 0.1 | 16.9705627 | 63.66 |
| HO | 11 | 10 | 2 | 0.1 | 14.1421358 | 63.66 |
| MN | 9.5 | 10 | 2 | 0.1 | 7.07106781 | 63.66 |
| SF | 12.7 | 10 | 2 | 0.1 | 36.1837662 | 63.66 |
| OJ | 13.4 | 10 | 2 | 0.1 | 46.0632611 | 63.66 |
| JND | 11 | 10 | 2 | 0.1 | 14.1421358 | 63.66 |
| NDC | 14.3 | 10 | 2 | 0.1 | 60.8111832 | 63.66 |
| BO | 15.4 | 10 | 2 | 0.1 | 78.3675324 | 63.66 |
| BCV | 15 | 10 | 2 | 0.1 | 70.7106781 | 63.66 |
| JB | 14.7 | 10 | 2 | 0.1 | 66.4680374 | 63.66 |
| VA | 12.4 | 10 | 2 | 0.1 | 33.9411255 | 63.66 |
| RND | 13.6 | 10 | 2 | 0.1 | 53.7401154 | 63.66 |
| LF | 12.2 | 10 | 2 | 0.1 | 31.1126984 | 63.66 |
| CN | 12.4 | 10 | 2 | 0.1 | 33.9411255 | 63.66 |
| RDB | 13.3 | 10 | 2 | 0.1 | 46.6690476 | 63.66 |

Cuadro A-6.2. Datos para la prueba de t de Student para la acidez titulable.

| Muestra | media | valor varda | número datos | s | t exp | t tab |
|---------|-------|-------------|--------------|----------|-------------|-------|
| AU | 0.577 | 0.750 | 3 | 0.00233 | -126.602914 | 9.82 |
| HO | 0.547 | 0.750 | 3 | 0.009686 | -35.558891 | 9.82 |
| SF | 0.633 | 0.750 | 3 | 0.0023 | -88.1086715 | 9.92 |
| OJ | 0.601 | 0.750 | 3 | 0.0174 | -14.6319293 | 9.92 |
| NDC | 0.665 | 0.750 | 3 | 0.00981 | -11.4763815 | 9.92 |
| BCV | 0.679 | 0.750 | 3 | 0.01 | -12.2975607 | 9.92 |
| VA | 0.602 | 0.750 | 3 | 0.002319 | -110.540543 | 9.92 |
| RND | 0.547 | 0.750 | 3 | 0.009 | -39.0673882 | 9.92 |
| LF | 0.547 | 0.750 | 3 | 0.00672 | -52.3223861 | 9.82 |
| CN | 0.565 | 0.750 | 3 | 0.00156 | -202.803417 | 9.92 |
| RDB | 0.186 | 0.750 | 3 | 0.0035 | -278.117873 | 9.92 |

Cuadro A-6.3. Datos para la prueba de t de Student para el pH.

| Muestra | media | Valor | número datos | s | t exp | t tab |
|---------|-------|-------|-----------------|-------|------------|-------|
| AU | 3.62 | 3.82 | 2 | 0.007 | 40.4057143 | 63.66 |
| HO | 3.68 | 3.82 | 2 | 0.007 | 29.284 | 63.66 |
| MN | 3.14 | 3.82 | 2 | 0.007 | 137.379429 | 63.66 |
| SF | 3.79 | 3.82 | 2 | 0.007 | 8.08114266 | 63.66 |
| OJ | 3.27 | 3.82 | 2 | 0.007 | 111.115714 | 63.66 |
| JND | 3.56 | 3.82 | 2 | 0.007 | 52.5274266 | 63.66 |
| NDC | 3.53 | 3.82 | 2 | 0.007 | 58.5882857 | 63.66 |
| BO | 3.04 | 3.82 | 2 | 0.007 | 157.582286 | 63.66 |
| BCV | 3.31 | 3.82 | 2 | 0.007 | 103.034571 | 63.66 |
| JB | 3.15 | 3.82 | 2 | 0.007 | 135.359143 | 63.66 |
| VA | 3.14 | 3.82 | 2 | 0.007 | 137.379429 | 63.66 |
| RND | 2.85 | 3.82 | 2 | 0.007 | 195.967714 | 63.66 |
| LF | 3.03 | 3.82 | 2 | 0.007 | 159.602571 | 63.66 |
| CN | 3.13 | 3.82 | 2 | 0.007 | 139.399714 | 63.66 |
| RDB | 2.67 | 3.82 | 2 | 0.007 | 232.332857 | 63.66 |

Cuadro A-6.4. Datos para la prueba de t de Student para el Índice de maduración.

| Muestra | Valor | L.superior | N. de datos | s | t exp | t tab |
|---------|-------|------------|-------------|-----|------------|-------|
| AU | 19.4 | 18 | 2 | 0.2 | 9.8994 | 63.66 |
| HO | 20.1 | 18 | 2 | 0.2 | 14.8491 | 63.66 |
| SF | 20.1 | 18 | 2 | 0.2 | 14.8491 | 63.66 |
| OJ | 22.3 | 18 | 2 | 0.2 | 30.4053 | 63.66 |
| NDC | 20.9 | 18 | 2 | 0.2 | 20.5059 | 63.66 |
| BCV | 22.1 | 18 | 2 | 0.2 | 28.9911 | 63.66 |
| JB | 19.7 | 16 | 2 | 0.2 | 12.0207 | 63.66 |
| VA | 20.6 | 16 | 2 | 0.2 | 18.3846 | 63.66 |
| RND | 25.2 | 18 | 2 | 0.2 | 50.9112 | 63.66 |
| LF | 22.3 | 18 | 2 | 0.2 | 30.4053 | 63.66 |
| CN | 21.9 | 18 | 2 | 0.2 | 27.5769 | 63.66 |
| RDB | 70.7 | 18 | 2 | 0.9 | 82.8092867 | 63.66 |

A- 7. Muestra de las curvas obtenidas en la determinación de la acidez total de los jugos de naranja analizados

