



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIRIQUÍ
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS
ESCUELA DE QUÍMICA

**CUANTIFICACIÓN DEL CONTENIDO DE AZÚCARES EN JUGOS DE FRUTAS
MEDIANTE HPLC- IR Y ESPECTROSCOPIA NIR**

Presentado por:
Luiggi Franco Guerra
4-806-757

TESIS PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE LICENCIADO EN QUÍMICA

Asesor:
Mariel Monrroy, *Dra.*

Co-asesores:
José Renán García M., *Dr.*
Heriberto Franco, *Dr.*

Chiriquí, República de Panamá
2022

DEDICATORIA

“Nunca se apartará de tu boca este libro de la ley, sino que de día y de noche meditarás en él, para que guardes y hagas conforme a todo lo que en él está escrito; porque entonces harás prosperar tu camino, y todo te saldrá bien”

Josué 1:8

A mi familia.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco siempre en primer lugar a Dios, por ayudarme a alcanzar las metas que me he propuesto, por tener cuidado de mí y ser mi soporte, quien me guía y acompaña dondequiera que voy.

Especial agradecimiento al Centro de Investigación en Bioquímica y Química Aplicada, al Dr. José Renán García, por permitirme llevar a cabo este trabajo en el centro de investigación y ser parte de mis asesores, al igual que el Dr. Heriberto Franco. A la Dra. Mariel Monrroy por ser mi asesora principal, por el conocimiento compartido, la ayuda y el apoyo brindado. A los licenciados Ónix Arauz y Deilyn Quiel por la ayuda y apoyo brindado en el desarrollo práctico de este trabajo.

A mi familia, por ser el pilar fundamental e inamovible en mi vida. Por el cariño brindado a lo largo de toda mi vida, el apoyo y amor que han sido esenciales para poder avanzar en cada paso que he dado. Infinitas gracias y amor para ustedes, Papá, Mamá, abuela, hermana y sobrina.

A la SENACYT y el IFARHU por brindarme la distinción de pertenecer durante toda la carrera a su programa de pregrado de excelencia para ciencias naturales y exactas.

A Nils Rosas y Arianna Contreras por el apoyo y la confianza brindada.

A todos y cada uno de los que formaron parte de este camino, tanto en el ámbito académico como fuera del mismo, siempre están en mis oraciones, Dios los bendiga.

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
ÍNDICE DE TABLAS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
RESUMEN	x
ABSTRACT	xi
I. MARCO INTRODUCTORIO.....	1
1.1 Aspectos generales del problema	1
1.2 Hipótesis	2
1.3 Objetivo general	2
1.4 Objetivos específicos.....	2
1.5 Alcance del Trabajo.....	2
1.6 Justificación	3
II. MARCO TEÓRICO	4
2.1 Carbohidratos	4
2.2 Carbohidratos en Alimentos	5
2.2.1 Industria alimentaria	5
2.2.2 Jugos de Fruta.....	6
2.3 Obesidad y diabetes.....	8
2.3.1 Obesidad	8
2.3.2 Diabetes.	9
2.4 Situación en Panamá	11
2.5 Técnicas tradicionales de análisis de azúcares	12
2.5.1 Cromatografía líquida de alta resolución con detector de índice de refracción.....	13
2.5.2 Espectroscopía de infrarrojo.....	17

2.5.3 Espectroscopía NIR y técnicas de análisis multivariado.....	24
2.6 Quimiometría	24
2.6.1 Concepto	24
2.6.2 Métodos de calibración	24
2.6.3 Etapas del proceso de modelado.....	28
2.6.4 Pretratamiento de datos.....	29
2.6.5 Proceso de calibración multivariante	32
2.6.6 Validación del modelo de calibración.....	33
III. MATERIALES Y MÉTODOS	35
3.1 Materiales y Reactivos	35
3.1.1 Materiales.....	35
3.1.2 Reactivos.....	36
3.2 Metodología.....	36
3.2.1 Muestras.....	36
3.2.2 Determinación de azúcares por cromatografía líquida de alta resolución.....	36
3.2.3 Análisis por espectroscopía de infrarrojo cercano.....	39
3.2.4 Calibración multivariada.....	39
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
4.1 Determinación de los parámetros para el análisis cromatográfico.....	41
4.2 Validación de la técnica cromatográfica.....	43
4.2.2 Parámetro de Linealidad, límite de detección y límite de cuantificación.	43
4.2.5 Exactitud	46
4.2.6 Precisión.....	47
4.3 Análisis de las muestras en HPLC	48
4.4 Determinación del contenido de azúcares por espectroscopía NIR	50
4.4.1 Análisis por Espectroscopía de Infrarrojo Cercano (NIR)	52
4.5 Calibración Multivariada	54

V. CONSIDERACIONES FINALES	64
5.1 Conclusiones	64
5.2 Recomendaciones	64
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
ANEXOS.....	71

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Etapas del proceso de construcción, validación y uso de un modelo quimiométrico.....	28
Tabla 2. Instrumentos y materiales utilizados para el desarrollo de la investigación.	35
Tabla 3. Reactivos.....	36
Tabla 4. Tiempos de retención de los carbohidratos en forma individual y como mezcla. 42	
Tabla 5. Tiempo de retención y amplitud de componentes A y B.....	43
Tabla 6. Resumen de los parámetros (linealidad, LD, DC, intervalo de trabajo).....	45
Tabla 7. Porcentaje de recuperación de las muestras enriquecidas.	46
Tabla 8. Valor absoluto de los porcentajes de error para los recuperados.	47
Tabla 9. Evaluación de la exactitud mediante uso de t student.	47
Tabla 10. Desviación estándar relativa de la recuperación de las muestras enriquecidas. .	48
Tabla 11. Resumen del análisis de muestras de jugo por HPLC.	50
Tabla 13. Bandas características de los polisacáridos y oligosacáridos.....	51
Tabla 14. Resumen estadístico de los azúcares determinados por HPLC.....	53
Tabla 15. Resumen de los parámetros estadísticos del modelo desarrollado.....	59
Tabla 16. Resumen de los parámetros estadísticos para la validación externa.	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Propiedades de los carbohidratos aprovechadas en la industria de los alimentos.	5
Figura 2. Esquema de un cromatógrafo de líquidos.	14
Figura 3. Celda con solo con eluyente /Celda con eluyente y muestra + eluyente.	17
Figura 4. Región infrarroja.....	18
Figura 5. Tipos de vibraciones moleculares.	18
Figura 6. Propagación típica de una onda por el espacio.	20
Figura 7. Incidencia de rayos NIR sobre las uniones químicas.	21
Figura 8. Principales técnicas de análisis multivariado aplicadas a la espectroscopía NIR.	26
Figura 9. Espectro de transmisión de una muestra de trigo integral, medido a intervalos de 2nm de 850 a 1048nm.....	30
Figura 10. Orden de elución del correspondiente a la Mezcla 1.	42
Figura 11. Estructuras químicas de glucosa, fructosa y sacarosa. Tomado de: OpenStax.	51
Figura 13. Espectros NIR de las muestras (jugos de fruta) en modo transmitancia.	53
Figura 14. Espectros NIR de los jugos convertidos en absorbancia y transformados usando la primera derivada.	54
Figura 15. Curvas del modelo de calibración y validación cruzada para sacarosa	60
Figura 16. Curvas del modelo de calibración y validación cruzada para glucosa.....	60
Figura 17. Curvas del modelo de calibración y validación cruzada para Fructosa	60
Figura 18. Curvas del modelo de calibración y validación cruzada para carbohidratos totales	61
Figura 19. Correlación entre los datos de referencia y los de la validación externa para sacarosa.	61
Figura 20. Correlación entre los datos de referencia y los de la validación externa para glucosa.....	62

Figura 21. Correlación entre los datos de referencia y los de la validación externa para fructosa.	62
Figura 22. Correlación entre los datos de referencia y los de la validación externa para carbohidratos totales.	63

RESUMEN

Los carbohidratos representan el grupo de compuestos orgánicos más abundantes en la naturaleza, además ocupan un papel indispensable en la alimentación humana, siendo los compuestos más consumidos en todo el mundo. Sin embargo, su consumo en cantidades significativas se asocia a diferentes tipos de padecimientos, principalmente, enfermedades no transmisibles, las cuales se consideran un importante problema de salud pública. Muchas de estas enfermedades se relacionan con el consumo de azúcares libres, las cuales podemos encontrar de forma cotidiana en varios de los productos que consumimos, como es el caso de los jugos de fruta comerciales. Dichos jugos suelen asumirse como una fuente más saludable, respecto a otro tipo de bebidas azucaradas como son los refrescos (coloquialmente “sodas”), sin embargo, muchos de estos jugos poseen la cantidad máxima de azúcar que se recomienda consumir en un día. Para lograr tener una visión del panorama local respecto a la cantidad de azúcar que contienen los jugos, en esta investigación se determinó el contenido de sacarosa, glucosa, fructosa y carbohidratos totales en jugos de frutas comercializados en la provincia de Chiriquí mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y espectroscopía NIR. En primera instancia se validó el método cromatográfico a partir de los parámetros de resolución, linealidad, límite de detección, límite de cuantificación, exactitud y precisión, obteniendo resultados aceptables. Una vez validado el método se determinó el contenido de azúcar por HPLC presentando en mg/mL valores mínimos de 0.052, 5.511, 6.036 y máximos de 101.7, 66.18, 82.42 para sacarosa, glucosa y fructosa respectivamente. Luego, se desarrolló un modelo de predicción para cada uno de los azúcares por espectroscopía NIR y análisis multivariado a partir de los datos obtenidos por HPLC y los espectros NIR registrado de las muestras. Los modelos de predicción desarrollados sobre la base del algoritmo PLSR, presentaron RMSEC de 4.2, 2.3, 3.65 y 4.1 y RMSECV de 5, 2.5, 4.3 y 5.4 para sacarosa, glucosa, fructosa y carbohidratos totales respectivamente, con R_c^2 y R_v^2 entre 0.94 y 0.99. Los modelos desarrollados por NIR fueron aplicados a un set de muestras externas obteniendo valores de bias bajos, RMSEP de 5.5, 4.0, 4.9, 5.6 y RPD de 5.2, 3.6, 3.8, 6.7, los valores obtenidos indican la buena capacidad de predicción del modelo pese a la heterogeneidad de las matrices analizadas. Contar con herramientas como la desarrollada en el presente trabajo, que permitan realizar análisis y obtener datos de forma rápida representa una gran ventaja para el desarrollo científico y tecnológico para el país, es por ello que el desarrollo de métodos de monitoreo, determinación o cuantificación de diferentes componentes en los alimentos constituye un aporte de gran importancia.

Palabras claves: Espectroscopía de infrarrojo cercano (NIR), HPLC, quimiometría, PLSR, análisis multivariados, azúcares, carbohidratos.

ABSTRACT

Carbohydrates are the most abundant organic compounds in nature and play an indispensable role in human nutrition, being the most consumed compounds worldwide. However, their consumption in appreciable amounts has been associated with various types of diseases, especially non-communicable diseases, which are considered an important public health problem. Many of these diseases are related to the consumption of free sugars that we find daily in various products, such as commercial fruit juices. These juices are generally considered a healthier source compared to other sugary beverages such as soft drinks (colloquially "sodas"); however, many of these juices contain the maximum amount of sugar recommended for daily consumption. In order to obtain an overview of the local panorama regarding the amount of sugar contained in juices, this study determined the sucrose, glucose, fructose, and total carbohydrate content of fruit juices marketed in the province of Chiriquí using high-performance liquid chromatography (HPLC) and NIR spectroscopy. Initially, the chromatographic method was validated based on the parameters of resolution, linearity, LOQ, LOD, accuracy and precision, obtaining acceptable results. After validation of the method, the sugar content was determined by HPLC, with minimum values of 0.052, 5.511 and 6.036 mg/ml and maximum values of 101.7, 66.18 and 82.42 mg/ml for sucrose, glucose and fructose, respectively. Then, a predictive model was developed for each of the sugars using NIR spectroscopy and multivariate analysis from the HPLC data and the NIR spectra of the samples. The prediction models developed based on the PLSR algorithm gave RMSEC values of 4.2, 2.3, 3.65, and 4.1 and RMSECV values of 5, 2.5, 4.3, and 5.4 for sucrose, glucose, fructose, and total carbohydrates, respectively, with R_c^2 and R_v^2 ranging from 0.94 to 0.99. The models developed by NIR were applied to a range of external samples and yielded low bias values, RMSEP of 5.5, 4.0, 4.9, 5.6 and RPD of 5.2, 3.6, 3.8, 6.7, indicating the good predictive capacity of the model despite the heterogeneity of the matrices analyzed. Having tools such as the one developed in the present work, which allow to perform analysis and obtain data quickly, represents a great advantage for the scientific and technological development of the country, so that the development of methods for monitoring, determination or quantification of different components in food is a contribution of great importance.

Keywords: (NIR) near infrared spectroscopy, HPLC, chemometrics, PLSR, multivariate analysis, sugars, carbohydrates.

I. MARCO INTRODUCTORIO

1.1 Aspectos generales del problema

La determinación de azúcares en alimentos, representa un punto indispensable en lo que respecta a la salud de la población, ya que, gran parte de los productos que se consumen en el diario vivir están relacionados con los carbohidratos, los cuales terminan siendo perjudiciales si se consumen en cantidades elevadas, es por ello, que es de suma relevancia contar con una herramienta versátil, efectiva y no destructiva que permita cuantizar el contenido de azúcar presente en los alimentos, en este caso puntual los jugos de fruta que se comercializan en los supermercados.

En el mundo el consumo de azúcares se relaciona perjudicialmente con el desarrollo de diversas enfermedades no transmisibles. Nuestro país no escapa a esta problemática, según datos de Caja de Seguro Social (2019), los informes revelados en el Censo de Salud Preventiva muestran que 46 % de la población panameña padece de algún grado de sobre peso u obesidad.

De acuerdo con cifras de la Federación Internacional de Diabetes (FID) 2022, para el año 2021 537 millones de adultos viven con diabetes. Se prevé que este número aumente a 643 millones para 2030 y 783 millones para 2045. Panamá pasó de tener, en 2011, 196 mil personas con diabetes a 236 mil en 2021 y se estima que el número crezca significativamente hasta alcanzar los 370 mil personas en el 2045.

Aunado a la problemática de salud, cabe destacar lo significativamente importante que resulta la implementación de la tecnología mediante diversos tipos de análisis en la industria alimentaria, no solo en el caso de la producción de los alimentos, sino también en el monitoreo y control de calidad de los alimentos que consume la población a diario. Aún más tratándose de técnicas que permitan realizar análisis rápidos y eficaces, lo cual es asequible implementando técnicas quimiométricas que permiten evaluar diferentes propiedades de las muestras de interés, al combinar en este caso, un método primario de cuantificación como es la cromatografía líquida de alta resolución con un método espectroscópico como es la Espectroscopía NIR. El desarrollo de este tipo de métodos proporciona innovación y avances en términos de ciencia y tecnología para el país.

En nuestro país existen escasos laboratorios encargados de monitorear los niveles de azúcares en alimentos y específicamente en jugos, contar con técnicas rápidas y confiables que permitan este monitoreo es de suma relevancia.

Los datos mostrados, no favorables a nivel mundial y nacional, llevan al cuestionamiento sobre la regulación y monitoreo de la cantidad de azúcares presente en los jugos de fruta que se consumen a diario, por lo que se planteó la siguiente pregunta: ¿Cómo desarrollar un método de cuantificación del contenido de azúcares en jugos de frutas por cromatografía líquida de alta resolución con índice de refracción y espectroscopía de infrarrojo cercano? para poder monitorear el contenido de azúcares en los jugos de frutas que consumen.

1.2 Hipótesis

Los métodos de cuantificación por HPLC-IR y espectroscopía NIR permitirán la determinación de azúcares en jugos de frutas comercializados en la provincia de Chiriquí.

1.3 Objetivo general

Cuantificar el contenido de azúcares por HPLC- IR y espectroscopía NIR en muestras de jugos de frutas comercializados en la provincia de Chiriquí.

1.4 Objetivos específicos

- a) Desarrollar y validar un método para la determinación del contenido de sacarosa, glucosa y fructosa, mediante HPLC – IR.
- b) Obtener modelos de predicción para la determinación de sacarosa, glucosa, fructosa y azúcares totales por espectroscopía NIR y análisis quimiométricos.
- c) Validar externamente los modelos desarrollados por espectroscopia NIR.

1.5 Alcance del Trabajo

El trabajo de investigación se realizó en el Centro de Investigación en Bioquímica y Química Aplicada (CIBQUIA) de la UNACHI. El CIQBUA proveyó de las condiciones de infraestructura, equipos especializados, capacidad técnica y de análisis quimiométricos necesarios para llevar a cabo la investigación. Esta investigación forma parte de las líneas de

investigación desarrolladas en el CIBQUIA en inocuidad alimentaria y la implementación y desarrollo de la espectroscopía de infrarrojo cercano como técnica de análisis.

1.6 Justificación

Como se ha descrito el consumo de azúcares libres está relacionado al desarrollo de diversas enfermedades como son diabetes, obesidad, enfermedades cardiovasculares y caries dental. Existen muchos tipos de snacks, o comidas chatarras con contenidos altos en azúcar, los jugos de frutas pertenecen a ese grupo de productos que en lugar de ser alimenticios son perjudiciales para la salud. Es de suma importancia conocer sobre las cantidades azúcares en los alimentos que son consumidos cotidianamente, a razón de que hay cantidades específicas recomendadas basados en la edad de la población que consume estos productos azucarados, según lo que nos dice la OMS.

En muchos países con leyes y medidas más estrictas respecto al contenido de azúcares, que contienen los alimentos, se ha observado que un alto porcentaje de los productos no cumplen con los valores determinados, por ejemplo, el caso concreto antes descrito en el marco teórico del Reino Unido, en el estudio realizado por Boulton et al., (2016).

Por lo cual, esta investigación propone cuantificar el contenido de azúcares por HPLC y desarrollar un modelo de cuantificación del contenido de azúcares en jugos de frutas por espectroscopía de infrarrojo cercano. La metodología propuesta permitirá un análisis rápido y confiable de los azúcares sacarosa, glucosa y fructosa en estos jugos que son comercializados no solo en la provincia de Chiriquí sino a lo largo del país.

Además, se creará una base de datos que pueda ser empleada en futuras determinaciones, y ampliada para otras bebidas. La implementación de técnicas de análisis por espectroscopía de infrarrojo cercano, ha demostrado ser muy eficaz en muchos ámbitos de las ciencias.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Carbohidratos

Los carbohidratos o hidratos de carbono son moléculas biológicas cuya composición básica está conformada por átomos de carbono, hidrógeno y oxígeno (CHO). Dentro de las ciencias químicas el término carbohidrato tiene más latencia en la bioquímica, donde el sinónimo de usura es sacárido, palabra de origen griego cuyo significado es azúcar (Avenas, 2012).

Se trata del grupo de compuestos orgánicos más abundantes en la naturaleza. Ocupan un papel indispensable en la alimentación de los seres humanos, siendo los compuestos más consumidos (entre 50 y 80 % en muchos países). Los carbohidratos que provienen del reino vegetal son más abundantes respecto de los provenientes del reino animal, esto se debe principalmente a que los carbohidratos vegetales son producto de la fotosíntesis y son los principales compuestos químicos que almacenan la energía radiante del sol (Badui, 2006).

Los carbohidratos son parte esencial de la vida, la mayor parte de los compuestos orgánicos que se encuentran tanto en plantas como animales son derivados de carbohidratos, de hecho, la síntesis de proteínas se lleva a cabo con aminoácidos que provienen de reacciones entre carbohidratos y diversas sustancias nitrogenadas. Generalmente, los azúcares simples no se encuentran libres en la naturaleza, sino en forma de polisacáridos, en forma de reserva energética, como es el caso de los almidones, a este tipo de carbohidratos se les suele denominar digeribles. En contraste, existen otros carbohidratos que se encuentran como parte de la estructura firme de un producto, como es el caso de la celulosa, pectinas, fibra dietética y hemicelulosa, que forman parte de los llamados no digeribles, que, sin embargo, cumplen una función importante mejorando el proceso de digestión (Badui, 2006).

Los carbohidratos se dividen en 4 grandes grupos que son: polisacáridos, monosacáridos, disacáridos y oligosacáridos. Los monosacáridos y polisacáridos de bajo peso molecular reciben el nombre de azúcares, por ejemplo, la denominada azúcar de mesa o común (sacarosa), fructosa y glucosa (Avenas, 2012). Atendiendo a su estructura química, los carbohidratos presentan distinta funcionalidad y características, que repercuten de diferentes maneras en los alimentos, por ejemplo, el sabor, la viscosidad, estructura y color. En otras palabras, las propiedades de los alimentos ya sea procesados o naturales, depende del tipo de

carbohidratos que contienen y de las reacciones químicas que en éstos intervienen (Badui, 2006).

2.2 Carbohidratos en Alimentos

2.2.1 Industria alimentaria

En la industria alimentaria los carbohidratos ocupan una posición primordial, esto se debe en parte a las diversas utilidades que se les da, las cuales se muestran en la Figura 1.

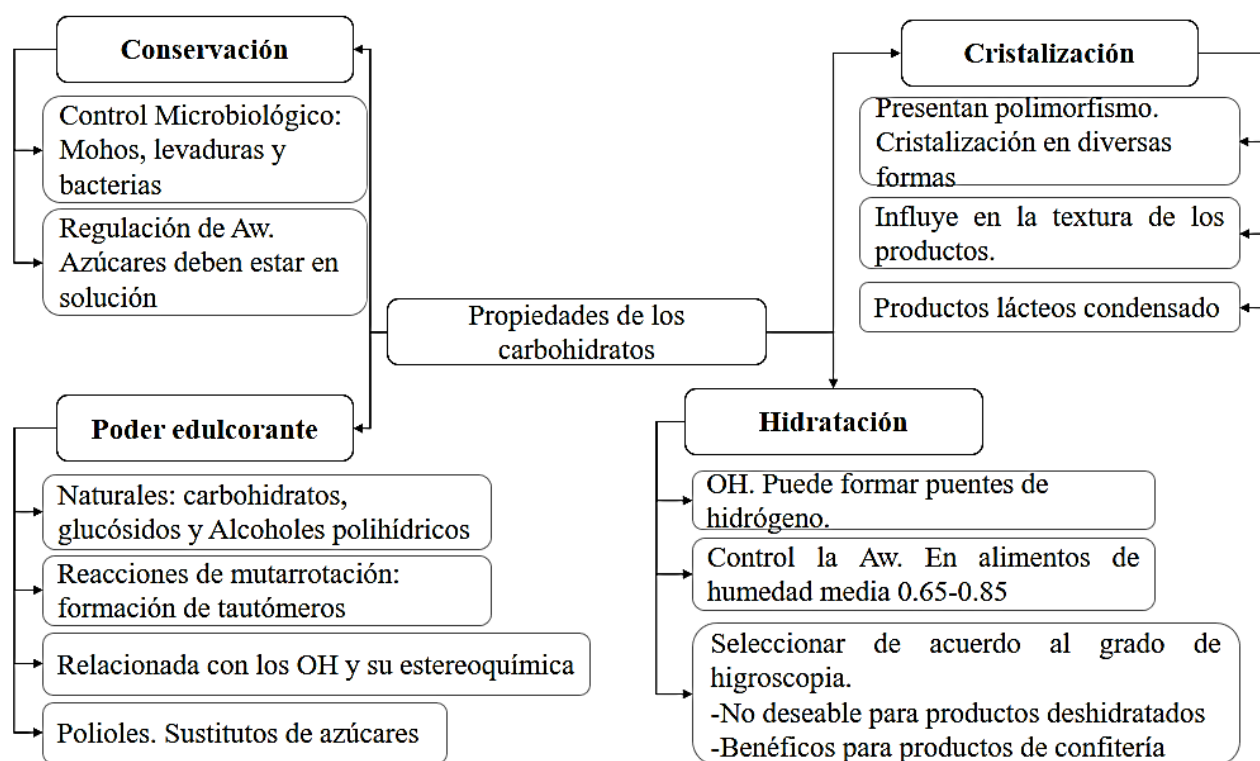


Figura 1. Propiedades de los carbohidratos aprovechadas en la industria de los alimentos. Adaptado de: Ramírez y Román (2017).

La Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE) y la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, ONUAA, o más conocida como FAO en sus proyecciones de perspectivas agrícolas 2020- 2029, muestran el

crecimiento potencial del azúcar en la industria de los alimentos para el final de la década, pese a la baja sufrida producto de la pandemia por Covid-19.

La caña de azúcar representa cerca del 86% de los cultivos de azúcar y la remolacha equivale al resto. Se prevé que la producción mundial de azúcar crecerá 15%, de 176 millones de toneladas (Mt) en el período base 2017-2019 a 203 Mt para 2029, el 96% del crecimiento previsto provendrá de países en desarrollo. Respecto el consumo, se prevé que habrá un aumento en torno al 1.4% anual y llegará a 199 Mt 2029, esto representa un incremento del consumo mundial per cápita de 22.5 kg/cáp a 23.5 kg/cáp, con variaciones considerables entre las regiones. Se prevé que los aumentos en el consumo mundial de azúcar durante los próximos 10 años provendrán exclusivamente de los países en desarrollo, África y Asia representarán el 30% y 68% de la demanda adicional respectivamente (**Anexo 1**). Por otro lado, para los países desarrollados se prevén tendencias bajas, atendiendo principalmente a mayor conciencia sobre los efectos en la salud que produce el consumir cantidades elevadas de azúcar, esto reforzado con medidas políticas (OCDE-FAO, 2020).

2.2.2 Jugos de fruta

Los jugos de fruta, son uno de los tipos de bebidas más consumidos, forman parte de las denominadas “bebidas no alcohólicas”, los hay de todos los sabores y en diferentes presentaciones, como enlatados, en recipientes plásticos o de vidrio. Especialmente cuando el clima es caluroso, son uno de los preferidos para saciar la sed, ya que la mayoría de las personas los asume más saludables que los típicos refrescos carbonatados.

Se puede llegar a pensar que los jugos artificiales, néctares son más saludables que un refresco, porque supuestamente están preparados a base de “frutas”, pero no es así. Una porción de refresco de aproximadamente 200 mililitros contiene cinco cucharadas de azúcar, mientras que una de jugo artificial puede llegar a tener ocho, esto según los resultados de la investigación realizada por el grupo Action on Sugar (2015).

Los miembros del grupo Action on Sugar en una de sus investigaciones titulada: “*How much sugar is hidden in drinks marketed to children? A survey of fruit juices, juice drinks and smoothies*”, efectuada en el 2015, con objetivo principal de investigar la cantidad de azúcares en jugos de frutas, jugos y batidos (FJJDS por sus siglas en inglés) comercializados para

niños. Analizaron 203 bebidas enfocados específicamente para los niños, dichos productos son dirigidos a los infantes asumiéndose como un sano complemento alimenticio (Boulton et al., 2016).

Utilizando un tamaño de porción estandarizado de 200 mL, los resultados de esta investigación muestran que el 64 % de los FJDS encuestados contendrían al menos la mitad de la ingesta máxima de azúcar de un niño pequeño para el día (9.5 g), y el 42% de los productos contienen una cantidad de azúcares recomendada para días completos (19 g para niños de 4 a 6 años). Según este estudio son especialmente preocupante las llamadas azúcares libres, el término se refiere a monosacáridos (como glucosa, fructosa) y disacáridos (como sacarosa) añadidos a los alimentos y bebidas, y azúcares presentes de forma natural en la miel, los jarabes, concentrados de jugo, los zumos de frutas y las frutas. Es un término que se utiliza para distinguir entre los azúcares que están presentes de manera natural en los carbohidratos sin refinar, como la fruta (Boulton et al., 2016).

Los azúcares libres son la causa dietética más importante de caries dental. Cuando se consume como bebida, la fructosa derivada de la fruta tiene la misma probabilidad de causar caries dental que el resto de azúcares (Sheiman, 2001). En la Encuesta de salud dental local infantil realizada por el sistema de Salud Pública de Inglaterra (2012), el 28 % de los niños de 5 años en Inglaterra tenían caries obvias en sus dientes de leche, aumentando al 35 % de los niños de 5 años en el noroeste. En 2013, el 12 % de los niños de 3 años había experimentado una caries dental evidente. La caries dental es la razón más común por la que los niños en Inglaterra son ingresados en el hospital. Además, una mayor ingesta de fructosa y bebidas endulzadas con azúcar se ha asociado con la obesidad infantil.

El consumo de azúcares libres, particularmente en forma de bebidas, puede representar un aumento en la ingesta total de azúcares y una reducción en el consumo de alimentos más valiosos desde el punto de vista nutricional, lo que conduce a una dieta poco saludable, aumento de peso y riesgo de enfermedades no transmisibles. Una diferencia clave entre la fruta entera y el jugo es el contenido de fibra. La fruta entera ralentiza el consumo y tiene un efecto saciante. Según reza la investigación en cuestión, el cuerpo metaboliza el jugo de fruta de una manera diferente en comparación con la fruta entera. Después del consumo de fruta entera, el cuerpo parece ajustar adecuadamente su ingesta energética posterior, mientras que

después del consumo de jugo de fruta, el cuerpo no compensa la ingesta energética (Boulton et al., 2016).

La Asamblea Mundial de la Salud de la OMS (2015), adoptó una meta mundial de reducción relativa del 25 % de las enfermedades no transmisibles para 2025. Esto incluye políticas para reducir el contenido de azúcares en las bebidas no alcohólicas, así como para reducir el impacto de la comercialización de bebidas no alcohólicas con alto contenido de azúcares en los niños.

La Organización Mundial de la Salud (2015) revisó las directrices que recomiendan reducir la ingesta energética diaria total de azúcares libres del 10 % a menos del 5 %.

2.3 Obesidad y diabetes

2.3.1 Obesidad

La obesidad se ha triplicado en todo el mundo desde 1975 en todas las divisiones de la sociedad. En 2016, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó que había 1.900 millones de adultos con sobrepeso en el mundo, de los cuales, 650 millones eran obesos. Esto equivale al 13 % de la población adulta mundial (OMS, 2018), para 2022 según datos del Atlas de Diabetes de la Federación Mundial de Diabetes se estima que 800 millones de personas son obesos y se prevé que para el 2030 1 de cada 5 mujeres y 1 de cada 7 hombres serán obesos.

En 2010, se estimó que el sobrepeso y la obesidad causaban 3,4 millones de muertes, el 3,9 % de los años de vida perdidos y el 3,8 % de los años de vida ajustados por discapacidad en todo el mundo, con importantes costes sanitarios implicados. Si continúan las tendencias recientes, se estima que habrá 2,16 mil millones de personas clasificadas como con sobrepeso y 1,12 mil millones como obesas para 2030 (OMS, 2018).

El consumo excesivo de alimentos poco saludables y refrescos endulzados con azúcares se ha relacionado con el aumento de peso, ya que proporciona una fuente considerable e innecesaria de calorías con poco o ningún valor nutricional (Action on Sugar, 2018).

En 2010, la OMS encargó una revisión sistemática de la literatura para responder a una serie de preguntas relacionadas con los efectos de los azúcares sobre el exceso de adiposidad. Estas

preguntas plantearon si reducir o aumentar la ingesta de azúcares en la dieta influye en las medidas de grasa corporal en adultos y niños, y si la evidencia existente respalda la recomendación de reducir la ingesta de azúcares libres a menos del 10 % de la energía total. La grasa corporal se seleccionó como un resultado en vista de la medida en que las comorbilidades de la obesidad contribuyen a la carga global de enfermedades no transmisibles.

El resultado del metaanálisis sugiere que la ingesta de azúcares es un factor determinante del peso corporal en personas que viven en libertad y que consumen dietas ad libitum. Los datos proponen que el cambio en la grasa corporal que ocurre con la modificación de la ingesta de azúcares es el resultado de una alteración en el equilibrio energético más que una consecuencia fisiológica o metabólica de los monosacáridos o disacáridos (OMS, 2015).

Debido a las causas multifactoriales de la obesidad, no sorprende que el efecto de reducir la ingesta sea relativamente pequeño. Sin embargo, al considerar el rápido aumento de peso que se produce después de una mayor ingesta de azúcares, parece razonable concluir que los consejos relacionados con la ingesta de azúcares son un componente relevante de una estrategia para reducir el alto riesgo de sobrepeso y obesidad en la mayoría de los países.

Además, el Comité Asesor Científico sobre Nutrición (SACN de Reino Unido) revisó los ensayos controlados aleatorios, que indicaron que el consumo de bebidas endulzadas con azúcares, en comparación con bebidas endulzadas sin calorías, da como resultado un aumento de peso y un aumento del índice de masa corporal (IMC) en niños y adolescentes. Los estudios de cohortes prospectivos también generalmente confirman el vínculo entre las bebidas endulzadas con azúcar y el aumento de la obesidad (Action on Sugar, 2018).

2.3.2 Diabetes

La OMS (2021) define la diabetes sacarina o diabetes mellitus como una enfermedad crónica que aparece cuando el páncreas no secreta suficiente insulina o cuando el organismo no utiliza eficazmente la insulina que produce. La insulina es una hormona que regula la concentración de glucosa en la sangre, es decir, la glucemia. El efecto de la diabetes no controlada es la hiperglucemia (es decir, la glucemia elevada), que, con el tiempo, daña gravemente muchos órganos y sistemas, sobre todo los nervios y los vasos sanguíneos.

Existe una combinación compleja de factores de riesgo genéticos y ambientales que juegan un papel en el desarrollo de la diabetes: tiende a agruparse en familias, pero también existe un fuerte vínculo con los factores de riesgo ambientales. La etnia también juega un papel importante en su desarrollo, por ejemplo: las personas de ascendencia del sur de Asia tienen seis veces más probabilidades de contraer la enfermedad (Action on Sugar, 2016).

La obesidad es el factor de riesgo más potente y representa el 80-85 % del riesgo total de desarrollar diabetes tipo 2. Dado que casi 2 de cada 3 personas en el Reino Unido son obesas o tienen sobrepeso; sus posibilidades de desarrollar diabetes tipo 2 en algún momento son altas a menos que tomen medidas evasivas (Action on Sugar, 2016).

Otros grupos de riesgo incluyen: personas mayores de 40 años; personas con enfermedad cardiovascular; mujeres con síndrome de ovario poliquístico (SOP); personas que toman medicamentos para la esquizofrenia o el trastorno bipolar.

La diabetes tipo 2 se produce como resultado de la falta de producción de insulina o de una mayor resistencia a la insulina. La insulina se libera en respuesta al aumento de los niveles de glucosa en la sangre y permite que las células individuales absorban la glucosa de la sangre para metabolizarla (Action on Sugar, 2016).

Una dieta alta en azúcar se ha relacionado con una mayor incidencia de diabetes tipo 2 debido a los vínculos entre la ingesta alta de azúcar y la obesidad. El SACN del Reino Unido (2015) realizó un metaanálisis, que incluye nueve estudios de cohortes en 11 publicaciones, que sugieren que existe una relación entre las bebidas endulzadas con azúcares y la incidencia de diabetes tipo 2. El vínculo entre el consumo de azúcar y la diabetes es tanto directo como indirecto: las bebidas endulzadas con azúcar están directamente relacionadas con la incidencia de diabetes tipo 2, y el consumo de azúcar también conduce a la obesidad, uno de los principales factores de riesgo para la diabetes tipo 2.

Existen varias complicaciones que se asocian con la diabetes tipo 2. Los más comunes son: nefropatía; enfermedad ocular, incluida la ceguera; amputación; depresión; neuropatía; disfunción sexual; complicaciones en el embarazo; demencia.

La recomendación actual para la ingesta de azúcar es que no supere el 10 % de la ingesta energética diaria. La revisión publicada por la SACN del Reino Unido (2015) ha destacado la necesidad de reducir aún más este porcentaje al 5 % (30 g de azúcares). La recomendación

para niños es de 24 g / día para niños de 5 a 11 años y de 19 g / día para niños de 4 a 6 años. En la actualidad, consumimos una proporción mucho mayor de azúcar cada día, con un porcentaje de consumo de azúcar entre 1,5 y 3 años de 11,9 %; de 4 a 10 años con un 14,7 % y de 11 a 18 años con un 15,6 %.

También es importante mantener un estilo de vida y una dieta saludables:

- ❖ Sin exceder la cantidad máxima de calorías por día: 2000 calorías al día para las mujeres y 2500 calorías al día para los hombres.
- ❖ Reducir la ingesta de azúcar a un máximo de 6 cucharadas al día (25 g).
- ❖ Reducir el consumo de bebidas azucaradas.
- ❖ Hacer ejercicio durante media hora, 5 veces a la semana (ejercicio de intensidad moderada).
- ❖ Mantener el peso corporal con un IMC saludable (entre 18,5 kg / m² y 24,9 kg / m²).
- ❖ Mantener una relación cintura-cadera saludable, ya que es un buen indicador de la grasa abdominal y, por lo tanto, de la diabetes.

Según los datos del Atlas de Diabetes de la Federación Internacional de Diabetes (FID) 2022, para el año 2021 se produjo a nivel mundial una muerte atribuible a la diabetes cada 5 segundos, lo que representó 6.7 millones de muertes. Según estos mismos datos 3 de cada 4 personas con diabetes viven en países de ingresos medios y bajos.

2.4 Situación en Panamá

Según el estudio realizado por la Organización Panamericana de Salud (OPS) 2019, los datos obtenidos en la región latinoamericana respecto del consumo de bebidas no alcohólicas muestran una marcada tendencia en aumento, siendo las bebidas azucaradas las más consumidas dentro de este grupo de bebidas no alcohólicas. Si bien es cierto que, para los años siguientes, hubo una importante baja en la comercialización de las bebidas azucaradas, encabezadas por los jugos de fruta, producto de la pandemia 2020, los datos muestran un crecimiento para el año 2022. Durante el 2022, el volumen promedio de jugos de frutas comerciales consumidos por los panameños es 6.85 L. Se espera que para el 2023 aumente 12.3 %. Para el 2026, se estima que el consumo de jugos de frutas comerciales ascenderá a 41.2 millones de litros en Panamá (STATISTA, 2022).

La tendencia ascendente está correlacionada con un marcado aumento en las variables asociadas con la nutrición y, como se muestra en la literatura especializada, con el consumo de bebidas azucaradas, el cual es uno de los principales factores para el desarrollo de la obesidad (OPS, 2019).

La prevalencia de la obesidad en Panamá representa un factor de riesgo importante a tal punto de considerarse un problema de salud pública; la prevalencia de obesidad fue del 27,1 % (IC 25,5-28,5) en el 2015 y se asoció significativamente con las siguientes variables sociodemográficas y biológicas: ser mujer, personas que viven en áreas urbanas, individuos entre 30 y 59 años, en afro panameños, en individuos que consumieron bebidas/alimentos ricos en azúcares (equivalente a 6 o más cucharadas de azúcar por día), en aquellos que realizaron menos de 60 min de actividad física actividad por semana, y en aquellos con antecedentes familiares de la obesidad (Mc Donald, 2015).

El principal problema de la obesidad reside en que las personas que la padecen tienen la propensión a desarrollar otros tipos de enfermedades que pueden incluso causar la muerte, como es el caso de la diabetes. En Panamá para el año 2021 se contabilizó un total de 236 mil personas con diabetes, lo que representó un gasto de 344.6 millones de dólares, se estima que para el año 2045 esta cifra ascienda a casi 370 mil personas, con un gasto que asciende a los 456 millones de dólares. El número de muertes atribuibles a la diabetes en el año 2021 fue de 2.119 mil, se reportó también que las principales complicaciones causadas por la diabetes en la población panameña que padece la enfermedad fueron enfermedades cerebrovasculares, enfermedad de la arteria coronaria y neuropatía (FID, 2022).

2.5 Técnicas tradicionales de análisis de azúcares

Existen diversas técnicas empleadas en el análisis de azúcares muchas de las cuales consisten en técnicas individuales o la unión de técnicas para optimizar el análisis de las azúcares y a la vez innovar en este tipo de análisis. A nivel internacional encontramos diversos métodos establecidos para el análisis de azúcares, pero con distinción los métodos de referencia más importantes son los de la ICUMSA™ (Comisión Internacional de Métodos Uniformes de Análisis del Azúcar). Esta comisión engloba una gran cantidad de técnicas enfocadas tanto a

la determinación como a la evaluación de parámetros y análisis de calidad de azúcares reductores, sacarosa, glucosa, fructosa, rafinosa, etc. En su repositorio se encuentra desde técnicas gravimétricas, polarimetría, grados Brix, cromatografía de gases, cromatografía iónica de alta resolución, cromatografía líquida de alta resolución, refractometría, entre otras, hasta las potentes técnicas espectroscópicas, las cuales son de las más recientes y poderosas para el análisis de azúcares y que se han combinado con otras técnicas mediante la implementación de quimiometría, como es el caso de la espectroscopia de infrarrojo cercano (NIR), que ha resultado ser una herramienta altamente eficaz y rápida al utilizarse en conjunto con técnicas cromatográficas y polarimétricas (ICUMSA, 2022).

2.5.1 Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).

La IUPAC (1974) define la cromatografía como el método usado para la separación de los componentes de una muestra, en la cual los componentes están distribuidos en dos fases, una estacionaria y una móvil, la fase estacionaria puede ser un sólido o un líquido retenido sobre un sólido o un gel esta fase se encuentra distribuida como una película o extendida como una capa, por otra parte, la fase móvil puede ser líquida o gaseosa. Dentro de las técnicas cromatográficas la HPLC, es la técnica más empleada en el área de química para realizar separaciones, identificaciones y cuantificar los constituyentes de una mezcla, mediante el reparto diferencial entre una fase móvil líquida y una fase estacionaria sólida (Agilent, 2016).

En base al tipo de interacción entre el analito y las fases estacionarias, esta técnica presenta distintos modos cromatográficos (Álvarez, 2021) como:

- ❖ Cromatografía de adsorción. En esta cromatografía la fase móvil es un líquido y la fase estacionaria es un sólido que puede ser alúmina, sílice o resinas de intercambio iónico, estas matrices tienen sitios electrostáticamente activos, debido a esto el analito es retenido por interacción electrostática.
- ❖ Cromatografía de partición. En esta cromatografía la separación de los analitos se da debido a la diferencia de sus polaridades o solubilidades entre la fase estacionaria y la fase móvil, ambas fases son líquidos inmiscibles. Para fases estacionarias existen también líquidos embebidos en sólidos y resinas.
 - Fase normal. Fase móvil apolar y fase estacionaria polar.

- Fase reversa. Fase móvil polar y fase estacionaria polar.
- ❖ Cromatografía de intercambio iónico. La fase estacionaria sólida posee grupos funcionales ionizables, estos iones son capaces de intercambiar su carga con el analito.
- Intercambio catiónico. Fase estacionaria con grupos cargados negativamente, retiene cationes (positivos).
 - Intercambio aniónico. Fase estacionaria con grupos cargados positivamente, retiene aniones (negativos).
- ❖ Cromatografía de exclusión molecular. La fase estacionaria está compuesta por un material poroso a través del que eluyen los analitos en función de sus tamaños

2.5.1.1 Instrumentación

De la forma más general posible un cromatógrafo líquido está compuesto por las partes que se muestran en la **Figura 2**.

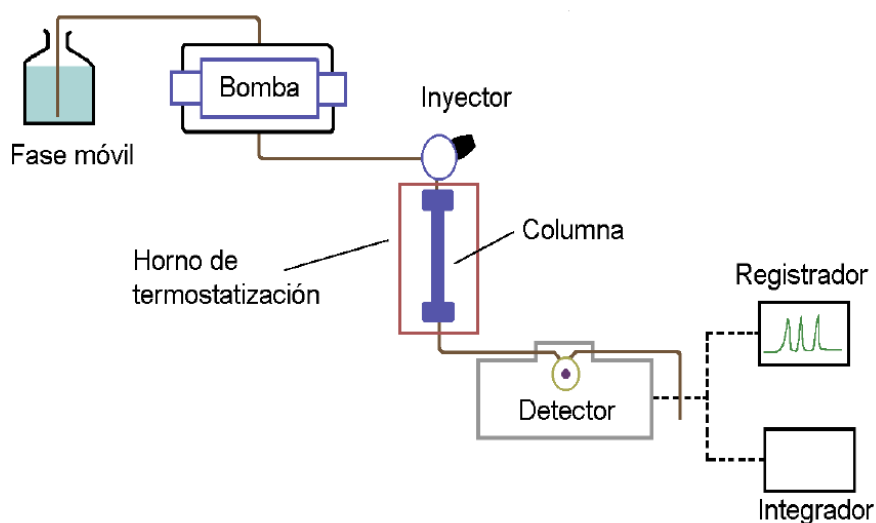


Figura 2. Esquema de un cromatógrafo de líquidos. Tomado de: UNIIQUIM (2016).

Para HPLC la fase móvil es líquida y puede corresponder a un solo tipo de eluyente o una mezcla de eluyentes, que bien pueden ser solventes individuales, una mezcla de los mismo, agua pura o una mezcla de agua y solventes orgánicos en proporciones en función del

análisis; el flujo de la fase móvil puede ser isocrático o en gradiente (Agilent Technologies, 2016).

El tipo de bombas que se utilizan en líquidos suelen clasificarse en función del modo de bombeo de la fase móvil: a flujo constante y a presión constante. Entre las principales bombas se encuentran las de tipo jeringa, reciproco y de pistón. Anteriormente las bombas más empleadas en HPLC eran las de tipo reciproco, sin embargo, los cromatógrafos modernos emplean bombas de doble pistón (García y Yusá, 2016).

Frecuentemente el factor que se asocia como limitante en la precisión de las mediciones en la cromatografía de líquidos es la inyección de la muestra. El problema es acentuado por el ensanchamiento de las bandas que acompaña al tapón o sobrecarga de inyección (Skoog et al., 2008). El inyector es el dispositivo que incorpora la muestra a la fase móvil para ser acarreado hasta la columna sin que se pierda el flujo proporcionado por la bomba. Los inyectores suelen ser de válvula (inyección manual) o autoinyectores, siendo los primeros los que se utilizan en prácticamente todos los equipos HPLC. En el caso de los autoinyectores, las inyecciones son programadas, en términos sencillos se trata de pequeños “robots” que realizan las inyecciones sin necesidad de la intervención de los analistas, esto permite que el equipo trabaje 24/7, lo que facilita la tediosa tarea de la inyección manual cuando se trata de una gran cantidad de muestras a analizar (García y Yusá, 2016).

Las columnas suelen medir de 10 a 30 cm de longitud, con diámetro interior de 3.5 a 4.6 mm, los tamaños de partículas de 5 micrómetros, existen rellenos porosos de distinto diámetro, núcleos poliméricos, de zirconio, alúmina, titanio, carbón poroso, hidroxiapatito entre otros. Respecto del material pueden ser acero inoxidable, algunas se fabrican con tubos de vidrio de paredes resistentes o con polímeros y también hay columnas de acero inoxidable cuyo interior está revestido con vidrio o polieteretercetona (García y Yusá, 2016 y Skoog et al., 2008).

Por lo general suelen emplearse pre columnas, con la finalidad de aumentar la vida media de la columna, ya que, las precolumnas eliminan la materia en suspensión, los contaminantes de los solventes y también los componentes de la muestra que se unen de manera irreversible a la fase estacionaria (García y Yusá, 2016).

Todos los detectores empleados en HPLC responden a alguna propiedad físico química del analito, y la disolución, por ejemplo, absorbancia UV, fluorescencia, índice de refracción, relación masa/carga, etc. La sensibilidad y selectividad del detector suele ser el determinante al momento de elegir el detector en base al tipo de analito (*CHROMacademy, s.f.). En el **Anexo 2** se muestra una tabla comparativa de la sensibilidad/selectividad de los principales detectores usados en HPLC. Siendo el detector de índice de refracción el principalmente utilizado para el análisis de carbohidratos.

Por último, está el registrador, habitualmente se trata de un computador con un software proporcionado por el fabricante del cromatógrafo. En el computador se registran los cromatogramas con las señales analíticas y la información (altura, tiempo de retención, amplitud, etc.) de las lecturas realizadas, lo que permite su integración y posterior uso de la información dependiendo de lo previamente especificado para el análisis.

2.5.1.2 Detector de índice de refracción (IR)

El detector de índice de refracción (IR) es un detector de respuesta universal (García y Yusá, 2016). Este detector es especialmente útil cuando las moléculas del analito no responden a ningún otro tipo de detector o si el analito muestra notables diferencias en el índice de refracción de la fase móvil (*CHROMacademy, s.f.).

El (IR) es una característica física definida de todos los compuestos, la detección está basada en equilibrar el detector a flujo constante con la fase móvil pura y medir el cambio de índice de refracción una vez aparece la muestra eludida con la fase móvil (Skoog et al. 2008).

La celda de flujo en el detector permite la medición dinámica y continua del índice de refracción del efluente de la columna. En la parte superior de la **Figura 3**, se muestra la sección de referencia de la celda de flujo que se llena con eluyente antes del análisis. De esta manera se puede determinar la respuesta de la línea base correspondiente al eluyente (la celda de referencia permanece llena durante todo el análisis). En la parte inferior se observa que a medida que la muestra pasa por la celda de flujo el índice de refracción cambiará y este cambio resultante provoca que el haz de luz se desvíe del detector puntual del fotomultiplicador (CHROMacademy, s.f.).

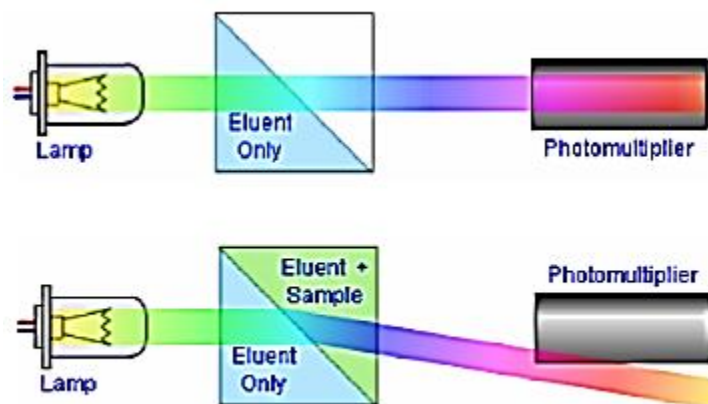


Figura 3. Celda con solo con eluyente /Celda con eluyente y muestra + eluyente.
Tomado de: CHROMacademy.

2.5.2 Espectroscopía de infrarrojo

La espectroscopía infrarroja se fundamenta en la absorción de la radiación infrarroja (IR) por las moléculas en vibración. Una molécula absorberá la energía infrarroja cuando dicha energía incidente es igual a la necesaria para que se dé una transición vibracional de la molécula. Es decir, la molécula comienza a vibrar de una determinada manera gracias a la energía que se le suministra mediante radiación infrarroja. La espectroscopía IR se utiliza para estudiar e identificar sustancias químicas o grupos funcionales en forma sólida, líquida o gaseosa, para ello se utiliza un espectrofotómetro, el cual, plasma la información obtenida en un espectro infrarrojo, que se puede visualizar en un gráfico de transmitancia o absorbancia vs longitud de onda o frecuencia (BRUKER, 2019 y Rubinson & Rubinson, 2000).

La región infrarroja del espectro electromagnético se sitúa entre $12500\text{-}10\text{ cm}^{-1}$ delimitada por el espectro visible y la región de microondas. Está dividida en tres zonas (Figura 4): IR cercano (NIR): $12500\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ ($800\text{-}2500\text{ nm}$); IR medio (MIR): $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$; IR lejano (FIR): $400\text{-}10\text{ cm}^{-1}$, siendo las regiones espectrales del infrarrojo cercano NIR e infrarrojo medio MIR donde se enmarcan la mayoría de las aplicaciones de distintos tipos de análisis, muchos de ellos en la industria de los alimentos. Las naturalezas de sus absorciones y la instrumentación utilizada son diferentes en cada región (García-González et al., 2013).

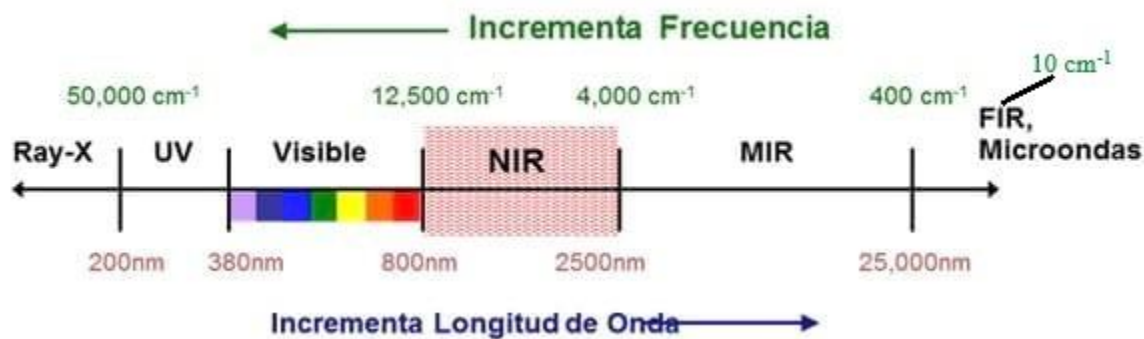


Figura 4. Región infrarroja. Tomado de: Salomón (2015).

Pueden distinguirse dos categorías básicas de vibraciones: de tensión y de flexión. Las vibraciones de tensión son cambios en la distancia interatómica a lo largo del eje del enlace entre dos átomos. Las vibraciones de flexión están originadas por cambios en el ángulo que forman dos enlaces (Rubinson & Rubinson, 2000 y Torres et al., 2009). En la **Figura 5** se representan los diferentes tipos de vibraciones moleculares.

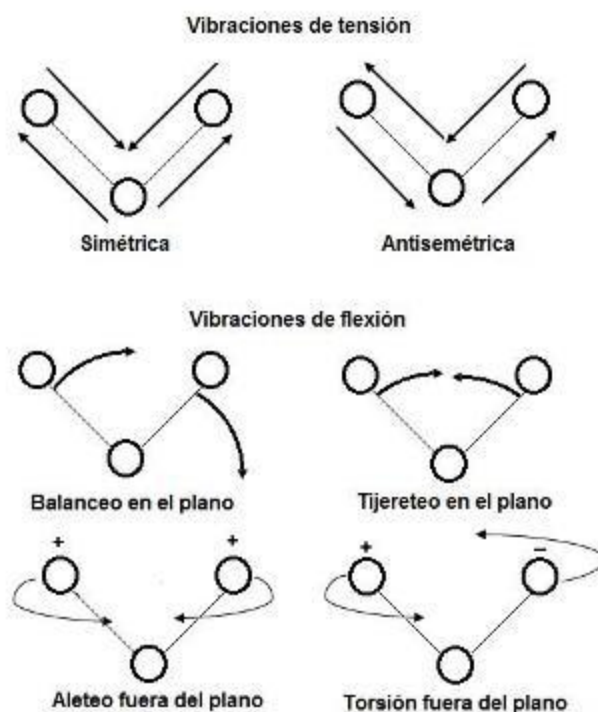


Figura 5. Tipos de vibraciones moleculares. Tomado de: Lazo (2018).

Cada molécula presenta un espectro infrarrojo característico al que se denomina huella dactilar, debido a que todas las moléculas presentan algunas vibraciones que, al ser activadas provocan la absorción de una determinada longitud de onda en la zona del espectro electromagnético correspondiente al infrarrojo, exceptuando las especies diatómicas homonucleares como O_2 y Br_2 . De esta manera es posible analizar cuáles son las longitudes de onda que absorbe una sustancia en la zona del infrarrojo y obtener información acerca de las moléculas que componen dicha sustancia (Torres et al., 2009 y Robinson & Robinson, 2000).

2.5.2.1 Espectroscopía de infrarrojo cercano (NIR)

La espectroscopía de infrarrojo cercano o espectroscopía NIR (del acrónimo en inglés “Near InfraRed”) describe el proceso de un método de análisis físico basado en la luz infrarroja de onda corta. La NIR emplea el rango espectral de 12500 a 4000 cm^{-1} (800 - 2500 nm). Las muestras, ya sean sólidas, líquidas o gaseosas, pueden absorber parte de la radiación incidente a longitudes de onda específicas. Al igual que ocurre en el infrarrojo medio, la espectroscopía de infrarrojo cercano es una técnica espectroscópica vibracional que se basa en la absorción producida cuando la frecuencia de vibración es igual a la frecuencia de la radiación infrarroja dirigida a la molécula. Ésta tiene que experimentar un cambio en su momento dipolar para que exista absorción de la luz incidente (Cozzolino, 2016).

Cuando existe superposición de muchas vibraciones de armónicos y combinaciones de modos vibracionales de los enlaces químicos C-H, N-H y O-H da como resultado bandas anchas con baja selectividad estructural en los espectros. Como se ha comentado anteriormente, las vibraciones moleculares son el origen de las bandas de absorción fundamentales localizadas en la región MIR. En el infrarrojo cercano se ven bandas de absorción que corresponden con sobretonos y bandas de combinación de vibraciones fundamentales. Estas últimas surgen por la interacción de dos o más vibraciones que tienen lugar simultáneamente y su frecuencia es la suma de los múltiplos de las frecuencias fundamentales relevantes. Por lo tanto, una molécula triatómica con 3 bandas fundamentales podría tener 3 primeros armónicos, 3 segundos armónicos y 6 bandas de combinación (Osborne, 2006).

Respecto de la intensidad de absorción, la misma disminuye cuando aumenta el nivel de armónicos. Sin embargo, la espectroscopía NIR proporciona información estructural más compleja que la espectroscopía MIR por su mayor energía de radiación y la implicación de las vibraciones de combinación (Cozzolino, 2016). La posición de la banda de absorción depende de propiedades tanto químicas como físicas, es decir, factores como la temperatura, humedad, carácter cristalino o tamaño de las partículas de la muestra influyen en el espectro obtenido en sí estos espectros obtenidos son de interés para identificación de sustancias en la llamada tecnología NIR.

De manera sintetizada, la tecnología de espectroscopía de infrarrojo cercano involucra radiación infrarroja interactuando con un material, donde una radiación electromagnética ocurre en forma de ondas. La longitud de onda es la distancia entre los dos picos o crestas, y se indica con el símbolo λ (**Figura 6**). La longitud de onda en el espectro NIR se mide normalmente en nanómetros (nm) donde $1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$ o $1000 \text{ nm} = 0.001 \text{ mm}$. (Groenewald, 2007).

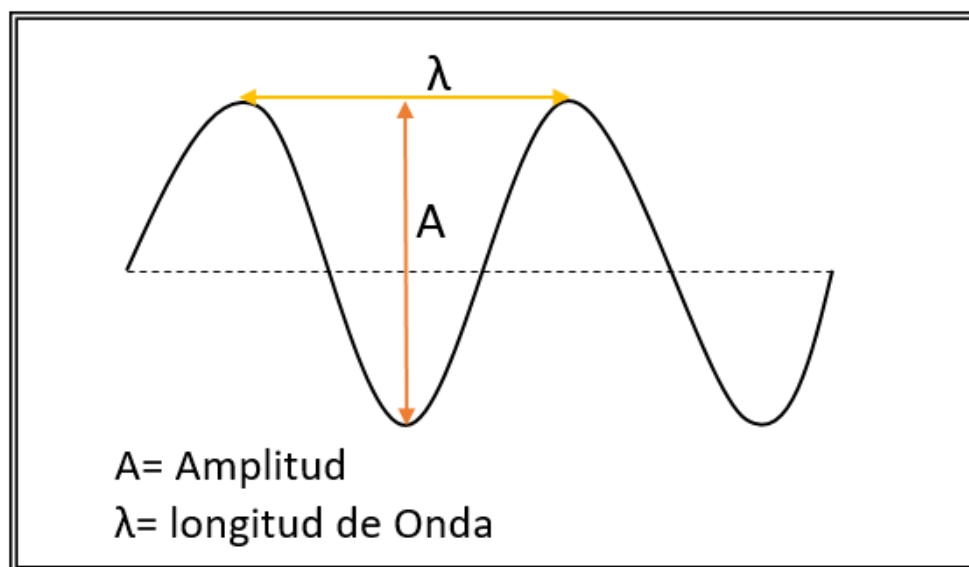


Figura 6. Propagación típica de una onda por el espacio.

De forma práctica, la muestra a ser analizada es bombardeada con rayos NIR de diferentes longitudes de onda, como se ilustra en la **Figura 7**. Por cada longitud de onda, algunos de los rayos serán entonces absorbidos por uniones químicas específicas. Al mismo tiempo,

otros rayos serán diseminados y reflejados por otras uniones químicas. Este proceso es comúnmente descrito como reflectancia NIR. En contraste, algunos de los rayos pasarán a través de la muestra, lo cual es denominado transmisión NIR (Groenewald, 2007).

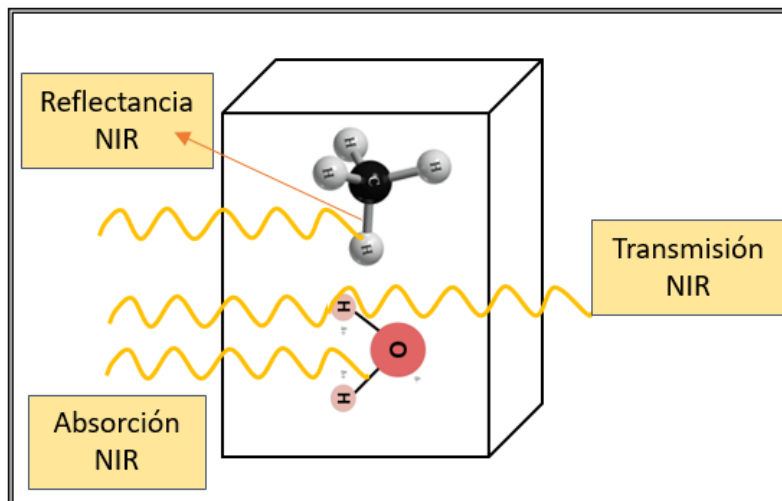


Figura 7. Incidencia de rayos NIR sobre las uniones químicas.

La transmisión NIR, según lo descrito por (Groenewald, 2007), donde el detector está ubicado detrás de la muestra, es ideal para líquidos transparentes y algunos productos que no son demasiado densos ópticamente.

2.5.2.1.1 Modos de registro NIR

Existen diferentes modos de registro para los espectros de las muestras. Los más habituales son: transmitancia, reflectancia difusa y transreflectancia (García, 2020). Estos modos de registro se expresan empleando las siguientes ecuaciones matemáticas.

$$A = \log \frac{1}{T} = \log \frac{I_0}{I} \quad (1)$$

$$A_{aparente} = \log \frac{R_{ref}}{R_m} = \log \frac{1}{R} = a'c \quad (2)$$

Donde A es la absorbancia, T la transmitancia, I_0 la intensidad de la radiación de la fuente de radiación, I la intensidad de la radiación que no es absorbida por la muestra, $A_{aparente}$ es la absorbancia aparente, c es la concentración y a' una constante de proporcionalidad que tiene absorptividad molar (a) y el coeficiente de dispersión (s) que depende de la longitud de onda de trabajo, R_m es la relación entre la luz reflejada por la muestra y por un estándar R_{ref} (García, 2020).

2.5.2.1.2 Espectroscopía NIR en la industria alimentaria

El correcto manejo de la espectroscopía NIR proporciona una poderosa herramienta para realizar diferentes tipos de análisis. En la industria alimentaria esta tecnología ha tenido especial relevancia en análisis de la calidad de la materia prima, los análisis de ingredientes de formulación y verificar la calidad del producto terminado.

Para el manejo de NIR no se requieren grandes destrezas, los instrumentos empleados son fáciles de operar, y los resultados están disponibles de inmediato. No obstante, el apropiado mantenimiento de la calibración es esencial para garantizar la obtención de resultados confiables. Finalmente, tomar decisiones informadas, basadas en algunos resultados analíticos (NIR, así como también análisis químicos tradicionales), es importante tomar en cuenta la variación normal dentro de un producto determinado, y consecuentemente, sabiendo lo que sería la exactitud esperada de los resultados (Groenewald, 2007).

La espectroscopía de infrarrojo cercano (NIR) es una técnica que permite la medición de carbohidratos en una amplia variedad de muestras. Hoy en día, la quimiometría NIR ha demostrado su eficacia para el análisis de carbohidratos tanto cualitativo como cuantitativo. La espectroscopía NIR tiene varias ventajas, como permitir que la muestra permanezca intacta después del análisis y dar acceso a múltiples propiedades químicas y físicas al mismo tiempo (López et al., 2017).

En el sector agroalimentario, el potencial de NIRS ha sido ampliamente investigado, esta es una herramienta muy poderosa que brinda información significativa sobre las propiedades internas y externas de las frutas, tales como contenido de azúcar, acidez total, pH, contenido de sólidos solubles, materia seca, firmeza. y hematomas, por mencionar algunos (López et al., 2017).

En el estudio realizado en Argentina por Zossi et al, (2010), se utilizó espectroscopía NIR en el desarrollo de la industria azucarera, se determinaron para las condiciones de la industria azucarera de Tucumán (Argentina), modelos de calibración más adecuados que permitan predecir los parámetros Brix y pol en jugo de caña de azúcar, mediante el empleo de un equipo NIRS, haciendo posible el reemplazo de los ensayos tradicionales de estos dos parámetros. Los resultados obtenidos de indicadores estadísticos, tales como error estándar de calibración (SEC), error estándar de predicción (SEP) y coeficiente de correlación de la calibración (R^2) fueron altamente satisfactorios en los parámetros evaluados y presentaron concordancia con los valores encontrados en la bibliografía mundial.

La espectroscopía NIR puede aplicarse a una amplia variedad de problemas, como la determinación del tamaño de las partículas, la determinación del mejor momento para la recolección y la investigación del origen geográfico de alimentos como las manzanas, la carne y el queso. Sin embargo, y en particular para el contenido de azúcar específico, NIRS en combinación con modelos PLSR se ha utilizado en tallos de sorgo y sorgo dulce (celulosa, lignina y hemicelulosa), zumos de frutas, arroz (amilosa), suero (lactosa), pastos (fructanos), maíz (carbohidratos no estructurales y solubles en agua), manzanas intactas para determinar fructosa, glucosa y sacarosa, naranja, albaricoque, remolacha azucarera, cerezas y otras frutas (López et al., 2017).

Según Monrroy et al., (2017 y 2015), la espectroscopía de infrarrojo cercano (NIR) combinada con el análisis quimiométrico es una técnica útil y poderosa utilizada para el control de calidad de diversas materias primas y productos en las industrias alimentaria, agrícola y forestal como el análisis de carbohidratos. A diferencia de los métodos de análisis convencionales, el NIR tiene las ventajas de no ser destructivo, requerir un tamaño de muestra pequeño y un tiempo de análisis corto, no utilizar reactivos químicos, ser amigable con el medio ambiente (ya que no se generan residuos) y permitir la determinación de varios parámetros en - / on-line, ofreciendo una alternativa de medición de bajo costo. Los métodos de análisis convencionales consumen mucho tiempo y material, mientras que la espectroscopía de infrarrojo cercano (NIR) y los análisis quimiométricos permiten una rápida determinación simultánea de diversas propiedades químicas o físicas sin el uso de disolventes o grandes cantidades de muestra.

2.5.3 Espectroscopía NIR y técnicas de análisis multivariado

En la espectroscopía NIR los avances en la instrumentación y las técnicas de análisis de datos multivariados han tenido un impacto significativo en la determinación de los cambios en la composición de los alimentos. La espectroscopía NIR mejora la reproducibilidad de los espectros y la precisión del número de onda, lo que puede minimizar los efectos de la interferencia del solvente. Las estadísticas multivariadas han proporcionado herramientas quimiométricas como el análisis de componentes principales (PCA) y los métodos de regresión de mínimos cuadrados parciales (PLSR) que pueden modelar relaciones entre un gran número de variables dependientes que tienen variaciones extremadamente complejas (como espectros NIR) y variables independientes (tales como concentraciones químicas). (Rodríguez-Saona et al., 2001).

2.6 Quimiometría

2.6.1 Concepto

El avance tecnológico en los laboratorios desde finales del siglo XX, trajo consigo la obtención de una cantidad enorme de datos, sin embargo, en la mayoría de los casos por si solos los datos no dan respuestas concretas a muchos problemas, es la interpretación de los mismo y el colocarlos en un contexto correcto lo que proporciona información útil para la resolución del problema. Surge entonces una disciplina con la finalidad de facilitar la interpretación de los datos a la que denominan quimiometría. La quimiometría se encarga específicamente de aquellos procesos que transforman señales analíticas, así como datos que son más o menos complejos mediante el uso de métodos de origen estadístico, matemático o procedentes del campo de la lógica formal (Grupo de Quimiometría y Cualimetría de Tarragona, 2002).

2.6.2 Métodos de calibración

Para clasificar los métodos de calibración se presentaron diferentes propuestas, siendo la presentada por Kowalski (1987) la que hasta día de hoy se utiliza. Esta es una clasificación meramente matemática y está dada en función de la dimensión de los datos de la muestra. De

esta forma se tienen datos relacionados a una sola variable (univariante) y los relacionados a más de una variable (multivariante).

2.6.2.1 Calibración univariante

Esta calibración relaciona una única variable de respuesta (y) con una única variable de predicción (x) empleando la ecuación de la recta (Ecuación 3). La calibración univariante consiste en la obtención de los coeficientes de la ecuación mediante el ajuste por mínimos cuadrados de las señales de las muestras que tienen un valor conocido. En química lo tradicional es que (y) corresponda a la variable dependiente, mientras (x) corresponde a la variable independiente (García, 2020).

$$y = mx + b \quad (3)$$

Dónde (y) habitualmente representa la señal analítica, (x) la concentración, (m) la pendiente y (b) el intercepto (aplicación en química).

2.6.2.2 Calibración multivariante

2.6.2.2.1 Concepto

Esta calibración relaciona una variable sencilla de obtener (como un espectro NIR) con una variable compleja de obtener o que requiere más tiempo para obtenerse (como la concentración de un compuesto, contenido de proteína, número de octano de la gasolina, etc.). La finalidad de la calibración multivariante es predecir la propiedad compleja a partir de la sencilla, esta calibración tiene clara ventaja respecto de la calibración univariante a razón de la primera puede detectar muestras discrepantes al momento de predecir (outliers), además de que no requiere medidas instrumentales selectivas, esto quiere decir que la muestra puede contener además del analito otros componentes que contribuyen a la señal de forma no constante (Ferré, 2006).

Existen diferentes métodos matemáticos que se emplean para realizar una calibración multivariante, generalmente estos métodos se clasifican en dos grandes grupos que son: los métodos cuantitativos y los cualitativos. Estos métodos se seleccionan en base a tipo de muestras a estudiar y al propósito mismo de la investigación, en el caso de los trabajos que

utilizan la espectroscopia NIR las principales técnicas de análisis multivariante se muestran en la **Figura 8**, así como también los 2 principales pre tratamientos que se les da a los datos, aunque existen muchos otros que se mencionan más adelante.



Figura 8. Principales técnicas de análisis multivariado aplicadas a la espectroscopía NIR. Adaptado de: López et al. (2017).

Todas las siglas del inglés. ANN, *Artificial Neural Network*. CA, *Cluster Analysis*. LDA, *Linear Discriminant Analysis*. PCA, *Principal Component Analysis*. PCR, *Principal Component Regression*. NPLS: *Non-linear Partial Least Squares*. PLSR, *Partial Least Squares Regression*. SIMCA, *Soft Independent Modeling of Class Analogies*.

2.6.2.2.2 Regresión por mínimos cuadrados parciales (PLSR)

Este método es presentado en 1975 por Herman Wold como alternativa a la regresión clásica (Castillo, 2007). La regresión por mínimos cuadrados parciales es un método inverso, que se basa en la reducción de variables al igual que PCA (Bernárdez, 2006). Se dice que una de las razones para el desarrollo de este método fue evitar el dilema de la elección de componentes para la ecuación de regresión que se tiene en la regresión de componentes principales (PCR) (Naes et al., 2004).

La notable diferencia que existe entre PCR y PLSR según Bernárdez (2006), es que en este ultimo la descomposición de la matriz espectral se realiza simultáneamente con la matriz de la propiedad a determinarse. Naes (2004), nos dice que en PLSR cada componente se obtiene maximizando la covarianza entre (y) y todas las posibles funciones lineales de (x), conduciendo a componentes que están más directamente relacionados con la variabilidad en (y) que los componentes principales.

PLSR ha sido particularmente exitoso en el desarrollo de modelos de calibración multivariante para espectroscopia NIR porque usa la información de concentración (variable Y) activamente para determinar cómo se calculan los factores de regresión a partir de la matriz de datos espectrales (X), reduciendo el impacto de las variaciones X irrelevantes en el modelo de calibración. Esta capacidad proporciona un conjunto de datos más rico en información de dimensionalidad reducida y elimina el ruido de datos que da como resultado modelos de calibración más precisos y reproducibles (Rodríguez-Saona et al., 2001).

Según García (2020), en PLSR los datos que se van a tratar suelen estar autoescalados o centrados, para la posterior descomposición de ambas matrices (x) y (y) las cuales se hacen de manera simultánea de la siguiente forma:

$$\mathbf{X} = \mathbf{TP}' + \mathbf{E} \quad (4)$$

$$\mathbf{Y} = \mathbf{UQ}' + \mathbf{F} \quad (5)$$

\mathbf{X} representa la matriz de los datos espectrales, \mathbf{Y} la matriz de la propiedad a determinar (por ejemplo, concentración de un analito), \mathbf{T} y \mathbf{U} son las matrices de los *scores*, \mathbf{P}' y \mathbf{Q}' las matrices de los *loadings*, y \mathbf{E} y \mathbf{F} las matrices residuales de los datos iniciales de \mathbf{X} y \mathbf{Y} (García, 2020).

La descomposición simultánea de las matrices establece una relación interna entre los *scores* de los bloques X y Y (Peguero, 2010), mediante de la siguiente ecuación:

$$\hat{\mathbf{U}} = \mathbf{bT} \quad (6)$$

\mathbf{b} representa el coeficiente de regresión de cada uno de los factores del modelo.

Para calcular el valor de Y de una muestra desconocida se utiliza la relación interna:

$$Y = T^* \hat{B} Q' + F \quad (7)$$

donde F es el residual de predicción, T^* es la matriz de *scores* de la muestra obtenida del modelo y \hat{B} es el coeficiente de regresión de cada factor y Q' la matriz del modelo (Peguero, 2010).

Para llevar a cabo la descomposición de matrices originales, uno de los principales algoritmos empleados es el algoritmo de mínimos cuadrados parciales interactivos no lineales NIPALS.

El algoritmo de mínimos cuadrados parciales interactivos no lineales NIPALS es la base de la regresión PLSR (Wold et al., 1987 y Wold, 1966). NIPALS realiza una descomposición singular (SVD) de una matriz de datos, mediante secuencias iterativas de proyecciones ortogonales. Con bases de datos completas se tiene equivalencia con los resultados del PCA, no obstante, es posible realizar el PCA con *missing data* y obtener sus estimaciones a partir de la matriz de datos reconstruida (González, 2016).

NIPALS tiene como principal característica el hecho de que trabaja respecto a una serie de productos escalares como suma de productos de los elementos emparejados. Esto permite manejar missing data, agregando en cada operación los pares disponibles. Geométricamente el procedimiento ‘toma’ los elementos *missing* como si ellos cayeran sobre la recta de regresión; no son puntos de apalancamiento (González, 2016).

2.6.3 Etapas del proceso de modelado

Para desarrollar y evaluar un modelo quimiométrico, con independencia de si es un análisis cuantitativo o cualitativo, se deben tomar en cuenta una serie de pasos básicos, para garantizar que los modelos desarrollados tengan estas etapas como característica común (Bernárdez, 2006). Estos pasos están sintetizados en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Etapas del proceso de construcción, validación y uso de un modelo quimiométrico.

N°	Etapas del modelado
1	Definición del objetivo
2	Preparación de las muestras

3	Obtención de la información analítica -Registro del espectro -Método de referencia
4	Selección de muestras Construcción y evaluación del modelo
5	-Pretratamientos de datos -Exploración de los datos -Selección del intervalo de longitudes de onda.
6	Validación del modelo
7	Aplicación del modelo
8	Mantenimiento del modelo

Adaptado de: García (2020).

Una vez se definido lo relacionado a las muestras y el método primario, que en este caso fue HPLC, se registran los espectros NIR para acoplar el método primario con el método espectroscópico mediante quimiometría. Sin embargo, antes de que esto se lleve a cabo los datos espectrales son pretratados.

2.6.4 Pretratamiento de datos.

Una vez registrados los espectros NIR de las muestras es posible que sea necesario aplicar un pretratamiento espectral que permita aumentar la relación señal/ruido, lo que incrementará la señal del analito de interés (Peguero, 2010). Los pretratamientos de datos más comunes según Castillo (2007), son:

❖ Suavizado espectral

El suavizado espectral se utiliza para reducir matemáticamente el ruido aleatorio o incrementar la relación señal/ruido mediante el uso de una ventana de puntos para determinar el valor central, desplazando la ventana a lo largo de todo el espectro. Los métodos de suavizado más empleados son el Savitzky-Golay y el de Transformada de Fourier (Bolaños, 2016).

❖ Derivadas

Comúnmente los espectros NIR presentan baja resolución, esto puede ser mejorado aplicando derivación, lo que permite aumentar las diferencias entre las bandas anchas y solapadas del

espectro. La aplicación de la primera derivada elimina los desplazamientos de línea base, mientras que la segunda derivada elimina los términos que varían linealmente con la longitud de onda (Bernárdez, 2006).

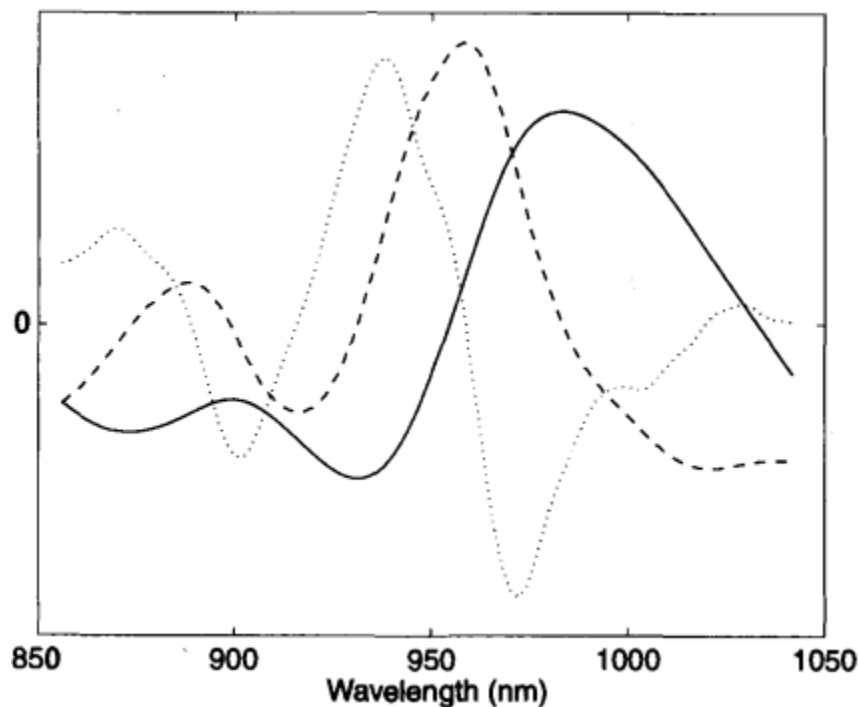


Figura 9. Espectro de transmisión de una muestra de trigo integral, medido a intervalos de 2nm de 850 a 1048nm (línea continua), junto a su primera (línea discontinua) y segunda (línea punteada) derivadas. Tomado de: Naes et al. (2004).

❖ **Variable normal estándar (SNV acrónimo del inglés *Standard Normal Variate*).**

SNV se utiliza principalmente para corregir el efecto de dispersión o *scattering* producido por las diferencias en el tamaño de partícula (Peguero, 2010). Este pretratamiento se aplica individualmente a cada espectro, sin depender de ningún espectro de referencia. De esta manera se obtiene una escala común a todos los espectros. Para llevar a cabo la corrección se resta el valor medio de absorbancia del espectro a cada uno de los valores de absorbancia a cada longitud de onda, dividiendo el resultado por la desviación estándar (σ) del espectro (Romero, 2001).

❖ Promedio de espectros

Se considera que el ruido es una variación instrumental aleatoria, por lo que promediando varias señales analíticas de una muestra el ruido disminuye y se mejora la relación señal/ruido (Bolaños, 2016).

❖ Centrado

El centrado es un pretratamiento que consiste en centrar cada una de las N variables restando la media de todos los elementos de esa variable. El valor de los vectores centrados es cero, sin modificar la varianza (Ramis et al., 2001).

$$X'_{i,m} = X_{i,m} - X_m \quad (8)$$

donde $X'_{i,m}$ es el dato centrado, $X_{i,m}$ es el dato de la fila i y la columna m (variable m) antes del centrado y X_m es la media de la columna m (Peguero, 2010).

❖ Autoescalado

Este pretratamiento sucede al pretratamiento de centrado, el autoescalado es básicamente un centrado seguido de una normalización (Castillo, 2007). En una matriz X ($M \times N$) cada elemento de una fila se autoescala de la siguiente manera:

$$X'_i = \frac{X_i - \bar{X}}{S} \quad (9)$$

donde X'_i es el dato autoescalado, \bar{X} y S son la media y la desviación de los elementos de esa fila.

❖ Corrección del efecto multiplicativo de la dispersión (MSC acrónimo del inglés

Multiplicative Scatter Correction).

Este pretratamiento tiene la misma utilidad que el SNV, con la diferencia de que en MSC el pretratamiento depende del conjunto de muestras al que se aplica (Peguero, 2010). La corrección se lleva a cabo mediante la aplicación a cada espectro original de los parámetros de la recta obtenida por mínimos cuadrados representando los valores de absorbancia de un intervalo de longitudes de onda en el que el analito no absorbe frente a los valores de absorbancia de un espectro de referencia (Romero, 2001).

❖ Orthogonal Signal Correction (OSC)

Según lo descrito por Peguero (2010), OSC realiza una corrección mediante la eliminación de toda aquella información contenida en los espectros que no esté correlacionada con la propiedad a determinar. OSC elimina la información contenida en la matriz de datos espectrales (X) que es ortogonal a la matriz de las concentraciones (Y) (Castillo, 2007). La aplicación de este pretratamiento permite obtener modelos de calibración más simples.

OSC puede definirse como:

$$X_{osc} = X - \sum_{i=1}^A T_i P_i^t \quad (10)$$

donde X_{osc} es la matriz de los datos originales X , a la cual se le sustrae el producto de matrices de *scores* y *loadings* que contienen la información no correlacionada con Y . A medida que el número de factores sea mayor, mayor será la varianza eliminada (Castillo, 2007).

2.6.5 Proceso de calibración multivariante

La calibración relaciona las medidas espectroscópicas del NIR con la propiedad física o constituyente medido por una técnica de referencia utilizando la técnica de análisis multivariante. La espectroscopía es una técnica empírica de las denominadas secundarias, esto quiere decir que requiere de otra técnica o método primario el cual sea capaz de cuantizar la propiedad de interés de la muestra y así complementar los datos ópticos del NIR con datos cuantizados.

El objetivo principal de la calibración por PLSR es la predicción de nuevas muestras, esto implica que el número de factores PLS óptimo está relacionado con obtener bajos errores en las Y , no obstante, el modelo debe ser capaz de explicar la matriz X (García, 2020).

El error de Y de las muestras calibración se evalúa empleando el error medio cuadrático de la calibración (RMSEC) acrónimo del inglés *Root Mean Square Error of Calibration*.

$$RMSEC = \sqrt{\sum_{i=1}^N (\hat{y}_i - y_i)^2 / (N - A - 1)} \quad (11)$$

donde N corresponde al número de muestras, \hat{y}_i es el estimado por la calibración, y_i es la propiedad conocida de las muestras y A es el número de factores utilizados para la calibración (Naes et al., 2004).

2.6.6 Validación del modelo de calibración

2.6.1 Concepto

La validación de un método consiste en verificar y documentar su validez, es decir, su adecuación a unos determinados requisitos establecidos que determinan los criterios de calidad del método a utilizar lo que garantizar la capacidad predictiva del mismo (Monfort, 2014). Naes et al. (2004) dice que la validación puede ser predictiva (externa) o cruzada.

2.6.2 Validación cruzada

La validación cruzada se basa únicamente en los datos de calibración. En esta validación se elimina en primer lugar la muestra uno del conjunto de calibración, luego se realiza la calibración al resto de muestras antes de que se pruebe la primera muestra mediante la comparación de y con \hat{y} . Luego se realiza el mismo procedimiento eliminando la muestra dos y así sucesivamente hasta haber probado cada una de las muestras. (Naes et al., 2004). El error de la validación cruzada se evalúa usando la siguiente ecuación:

$$RMSECV = \sqrt{\sum_{i=1}^N (\hat{y}_{CV,i} - y_i)^2 / N} \quad (12)$$

donde $\hat{y}_{CV,i}$ es el estimado de la propiedad basado en la validación (Naes et al., 2004).

El valor RMSECV incluye una fuente de error relacionada al error aleatorio, el error estándar de remuestreo (SECV acrónimo del inglés *Standard Error of Cross-Validation*) equivale a la desviación estándar y el sesgo (*Bias*) relacionado al error sistemático (García, 2020).

$$RMSECV^2 \approx SECV^2 + Sesgo^2 \quad (13)$$

La desviación estándar de los resultados hallados por *cross-validation* es:

$$SECV = \sqrt{\sum_{i=1}^N (\hat{y}_i - y_i - Sesgo)^2 / N} \quad (14)$$

La cuantificación del error sistemático se define usando la siguiente ecuación:

$$Sesgo = \sum_{i=1}^N (\hat{y}_i - y_i)^2 / N \quad (15)$$

2.6.3 Validación externa (prueba de predicción)

La validación externa o prueba de predicción a diferencia de la validación cruzada, usa datos ajenos a la calibración, es decir que las muestras para esta validación son independientes al set de muestras del modelo de calibración, sin embargo, las muestras para la predicción deben ser representativas respecto del modelo y de las muestras que se analizaran en un futuro. Esta prueba de predicción es el método de validación en concepto más sencillo, ya que este método realiza una predicción con todas las estimaciones de coeficientes ya calculadas (Naes et al., 2004). La estimación de prueba de predicción está definida por el error cuadrático medio de predicción:

$$RMSEP = \sqrt{\sum_{i=1}^{N_p} (\hat{y}_i - y_i)^2 / N_p} \quad (16)$$

donde N_p es el número de muestras usadas en la prueba de predicción.

Al igual que en la validación cruzada RMSEP incluye errores

$$RMSEP^2 \approx SEP^2 + Sesgo^2 \quad (17)$$

La desviación estándar de los resultados hallados por la prueba de predicción es:

$$SEP = \sqrt{\sum_{i=1}^{N_p} (\hat{y}_i - y_i - Sesgo)^2 / (N_p - 1)} \quad (18)$$

La cuantificación del error sistemático se define usando la siguiente ecuación:

$$Sesgo = \sum_{i=1}^{N_p} (\hat{y}_i - y_i)^2 / N_p \quad (19)$$

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales y Reactivos

3.1.1 Materiales

Tabla 2. Instrumentos y materiales utilizados para el desarrollo de la investigación.

Equipos e instrumentos	Capacidad
Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución (HPLC)	----
Balanza Analítica Biobase	Máx. 100g Min. 0.0001g
Centrifuga <i>LabniqueTM</i>	----
Sonicador Elma Sonic S60H	----
Bomba de vacío VACUUBRAND	----
Sistema de filtrado Wheaton \$40/35	----
Filtro de Membrana Nylon	47mm 0.22µm
Espectrofotómetro UV-VIS-NIR Shimadzu UV-3600 i plus	185 nm a 3300 nm
Micropipetas Shcheer	100 – 1000 µL
Botellas lavadoras	200 mL
Vasos químicos	30, 50, 100 y 600 mL
Volumétricos	100 mL
Filtros de Jeringa MS Nylon	13mm 0.22µm; 25mm 0.22µm
Filtros de Jeringa PTFE	25mm 0.22µm
Tubos de centrifuga	15 y 50 mL
Viales ámbar	1.5 mL
Vortex	----

Horno	----
-------	------

3.1.2 Reactivos

Tabla 3. Reactivos

Reactivo	Concentración
Sacarosa	----
Fructosa	----
Glucosa	----
Agua HPLC filtrada	----

3.2 Metodología

3.2.1 Muestras

Se realizó un inventario de los productos de jugos de frutas disponibles en los supermercados de la localidad, en el inventario se consideraron diferentes sabores, marcas y volúmenes. Se seleccionaron 75 muestras, representando el total de muestras inventariadas. Las muestras intactas en sus envases fueron conservadas en refrigeración, hasta su análisis por HPLC.

3.2.2 Determinación de azúcares por cromatografía líquida de alta resolución

Las muestras se conservaron refrigeradas en sus envases sellados y solo fueron abiertas el día de su lectura en el HPLC, las mismas se trasvasaron en tubos de 50 mL y se realizó un cálculo aproximado del factor de dilución (FD) para adecuar la concentración de la muestra a la curva de calibración, las cantidades de muestras fueron tomadas en unidades de (μL) con una micropipeta de 1000 μL y se agregaron a volumétricos de 10 mL aforando con agua HPLC, posteriormente se realizó un filtrado con filtro de 0.22 μm y el filtrado se conservó en tubos de 15 mL (tanto la muestra 50 mL como el filtrado fueron guardados en congelación a -18°C). La muestra filtrada se sometió a un baño ultrasónico en viales de 1.5 mL por 15 minutos y luego de esto se inyectó por triplicado en el HPLC (volumen de inyección: 20 μL).

Las muestras se caracterizaron para el contenido de sacarosa, glucosa y fructuosa. La muestra centrifugas y diluida fue analizada usando un cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC) (Agilent 1260 infinity, USA) con detector de índice de refracción y una columna Hi Plex Plomo en modo isocrático bajo las condiciones establecidas; flujo 0.6 mL/min, columna a 70 °C y fase móvil 100 % agua. El contenido de azúcares se cuantificó contra curva de calibración de sacarosa, fructuosa y glucosa (intervalo: 0.15-1.5 mg/mL).

Los parámetros de resolución, linealidad, precisión, exactitud, límite de detección y límite de cuantificación fueron determinados para validar el método cromatográfico.

❖ Resolución

Cuando se desarrolla un método por HPLC lo más importante es obtener una resolución óptima en el tiempo mínimo (CHROMacademy, s.f.). La resolución se determina utilizando la siguiente ecuación:

$$R_s = \frac{2[(t_R)_B - (t_R)_A]}{W_A + W_B} \quad (20)$$

A y B son analitos adyacentes, B es el compuesto retenido con más fuerza y A es el analito retenido con menos fuerza.

❖ Linealidad

El parámetro de linealidad permite conocer hasta donde la relación entre la señal y la concentración del analito, es directamente proporcional. Para ello se construyó curvas de calibración de cada compuesto. Se prepararon soluciones de sacarosa, glucosa y fructosa en distintas concentraciones por triplicado, 5 concentraciones por carbohidratos (0.15, 0.375, 0.75, 1.05, 1.5 mg/mL).

❖ Exactitud y precisión.

Estos parámetros fueron medidos utilizando muestras enriquecidas con los estándares de los analitos. Para ello se evalúan concentraciones bajas, medias y altas de cada estándar

agregando el estándar (concentración conocida) a la muestra a enriquecer y se promedian los valores de recuperación obtenidos.

La precisión se expresó como el RSD de las repeticiones, mediante la siguiente ecuación:

$$RSD = \frac{\sigma_r}{\bar{x}_r} \times 100 \quad (21)$$

Donde σ_r es la desviación estándar del recuperado y \bar{x}_r el promedio.

La exactitud se expresó como el porcentaje de recuperación:

$$R\% = \frac{a - b}{c} \times 100 \quad (22)$$

Donde a es la concentración de la muestra más el estándar adicionado, b es la concentración del analito en la muestra y c es la concentración del estándar adicionado. Luego se calculó el porcentaje de error:

$$E\% = \frac{R_{experimental} - R_{teórico}}{R_{teórico}} \times 100 \quad (23)$$

❖ Límite de detección (LD)

Corresponde a la concentración más baja del analito que pueda ser detectada cuya diferencia con el blanco es significativa. Para determinar este parámetro se calcula la señal mínima detectable Y_{LD} y la concentración mínima detectable C_{LD} , de la siguiente manera:

$$Y_{LD} = b + 3S_{Y/X} \quad (24)$$

$$C_{LD} = 3S_{Y/X}/m \quad (25)$$

Donde $S_{Y/X}$ es la desviación de la señal del blanco calculada como la **desviación estándar de la curva de calibración**, b es el intercepto y m es la pendiente.

❖ Límite de cuantificación (LC)

Corresponde a la concentración más baja de analito que puede ser cuantificada por el método. Para determinar este parámetro se calcula la señal mínima cuantificable Y_{LC} y la concentración mínima cuantificable C_{LC} , de la siguiente manera:

$$Y_{LC} = b + 10S_{Y/X} \quad (26)$$

$$C_{LC} = 10S_{Y/X}/m \quad (27)$$

Donde $S_{Y/X}$ es la desviación de la señal del blanco, b es el intercepto y m es la pendiente.

3.2.3 Análisis por espectroscopía de infrarrojo cercano

Registro y pretratamiento de los espectros

Las muestras guardadas en congelación a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ se descongelaron a temperatura ambiental, únicamente el día de su análisis, una vez atemperadas las muestras fueron centrifugadas a 2500 r.p.m. y con el sobrenadante se realizaron las lecturas en el NIR.

Para el registro de espectros se empleó un espectrofotómetro UV-Vis-NIR Shimadzu UV-3600 con fuente de Tungsteno-Deuterio, detector InGaAs y PbS en el rango infrarrojo cercano y software LabSolutions UV-Vis. Los espectros fueron registrados con intervalo de 1 nm en el rango espectral de 1000-2500 nm, en modo transmitancia, resolución de 5 nm, a velocidad de escaneo media. Se realizaron 4 ‘scans’ para cada muestra y el promedio de los mismos se empleó para el análisis y modelado de los datos. Los datos fueron transformados absorbancia y pretratados mediante suavizados, derivadas y SNV (Monroy et al., 2015 y 2017).

3.2.4 Calibración multivariada

Los modelos de calibración se desarrollaron sobre la base de algoritmos de regresión por mínimos cuadrados parciales (PLSR) utilizando distintos softwares quimiométricos.

Todos los modelos fueron interna y externamente validados. La validación interna estuvo basada en una validación cruzada completa (CV). Cincuenta muestras se emplearon para construir el modelo de calibración y diez para la validación externa. La exactitud de las calibraciones se expresó por la raíz de los errores cuadráticos medios de calibración y validación (RMSEC y RMSECV). La habilidad de predicción de los modelos de calibración desarrollados se evaluó calculando la raíz del error cuadrático medio de predicción (RMSEP) y bias.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Determinación del contenido de azúcares por HPLC-IR

Para el desarrollo del modelo de cuantificación de carbohidratos en jugos de fruta es necesario emplear un método primario que permita cuantificar la cantidad de azúcar presente, ya que por sí sola la técnica multivarida en uso no es capaz de hacerlo, siendo que la regresión por mínimos cuadrados parciales PLSR es un método que por sí solo no cuantifica. Dicho lo anterior es menester el uso de un método cuantitativo, el método elegido fue la cromatografía líquida de alta resolución con detector de índice de refracción HPLC-IR. Este método analítico permite separar e identificar los analitos y mediante calibraciones univariadas elaborando curvas de calibración con patrones, por extrapolación, permite cuantificar los analitos de interés. Para ello se determinan en primer lugar los parámetros para el análisis.

4.1 Determinación de los parámetros para el análisis cromatográfico

Para el desarrollo de este trabajo se utilizó una columna Hi-Plex Pb. Estas columnas presentan requisitos instrumentales sencillos y brindan análisis de carbohidratos fiables, a diferencia de las columnas de cromatografía iónica, esta columna utiliza agua pura y no es necesario la regeneración de iones ni supresores (Agilent Technologies, 2022). El medio consiste en un gel robusto de estireno-divinilbenceno que está impregnado con el catión Pb. con un tamaño de partículas de 8 μm y condiciones operacionales de flujo entre 1 y 0.6 mL/min, temperaturas entre 70° y 90° C, presión máxima de 50 bar y presión típica de 6 o 7 bar. (Agilent Technologies, 2020).

Los análisis se llevaron a cabo con elusión tipo isocrático utilizando como fase móvil agua, sin embargo, aunque el tipo de fase móvil fuese distinto el análisis de carbohidratos seguiría desarrollándose en modo isocrático, debido a que el análisis de los carbohidratos por HPLC utilizó un detector acoplado de índice de refracción (IR). La necesidad de reequilibrar el detector cuando se efectúan cambios en la composición de la fase móvil lo hace inutilizable en las separaciones con gradientes (Quattrocchi et al., 1992). Siguiendo los parámetros típicos de trabajo para la columna Hi-Plex Pb, se utilizó agua como fase móvil, un flujo de 0.6 mL/min, temperatura de columna 70°C y temperatura de detector 40°C.

Teniendo definido los parámetros respecto de la columna, se procede a determinar el orden de elución de los carbohidratos (sacarosa, glucosa, fructosa). Para ello se inyectaron patrones

de los carbohidratos a concentraciones de 1.5 mg/mL de forma individual y como mezcla. En la **Tabla 4** se muestran los tiempos de retención obtenidos, que se asignan a cada azúcar. Se obtiene entonces un orden de elución donde el primer pico corresponde a sacarosa, el segundo a glucosa y el tercero a fructosa como se muestra en la **Figura 10**.

Tabla 4. Tiempos de retención de los carbohidratos en forma individual y como mezcla.

Compuesto	tR1	tR2	tR Mezcla 1	tR Mezcla 2
Sacarosa	12.191	12.194	12.191	12.193
Glucosa	14.284	14.285	14.283	14.285
Fructosa	20.331	20.348	20.378	20.418

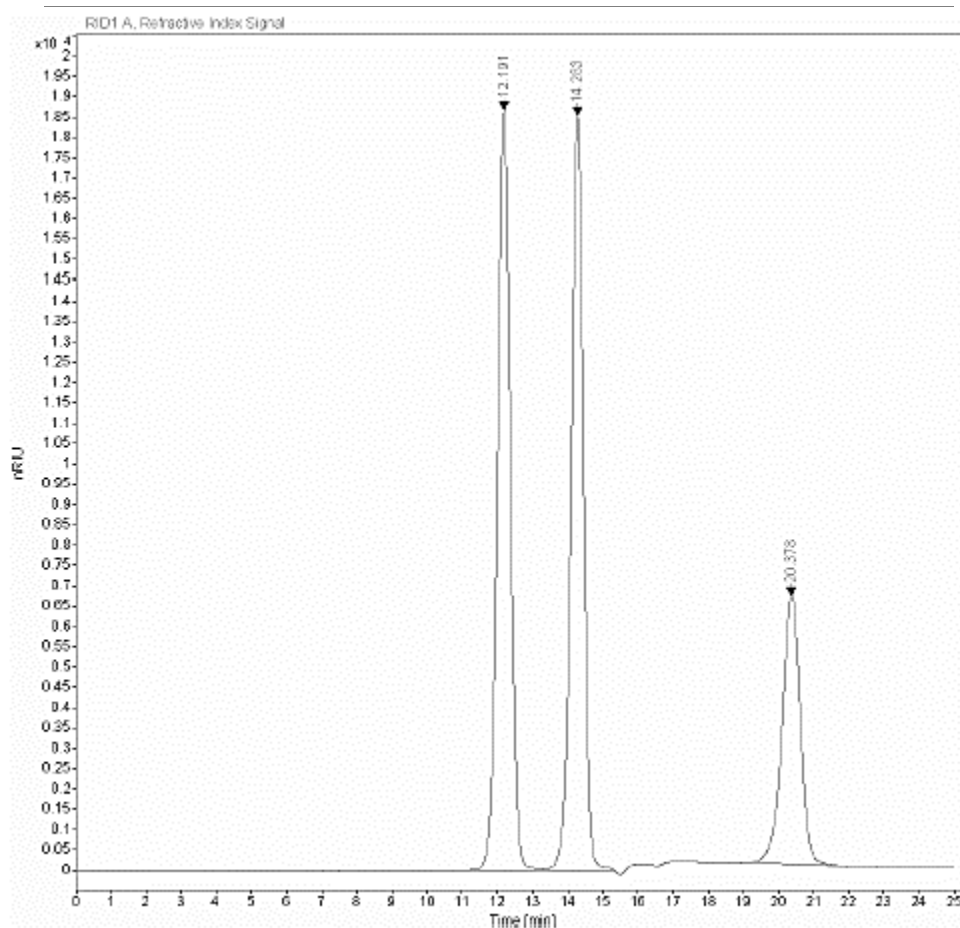


Figura 10. Orden de elución del correspondiente a la Mezcla 1.

Con los valores correspondientes al cromatograma que se muestra en la **Figura 10**, se puede determinar la resolución, parámetro fundamental en el desarrollo y en la validación de un método HPLC.

4.2 Validación de la técnica cromatográfica

Una vez se ha desarrollado el método de análisis por HPLC-IR se procede a validarlo para demostrar la funcionalidad del mismo. La validación es el proceso de verificación sobre la aptitud de un método para resolver un problema analítico específico (CYTED, 2009). La ISO 9000 define la validación como la confirmación mediante el aporte de evidencia objetiva de que se han cumplido los requisitos para un uso específico previsto.

4.2.1 Resolución

La resolución se determinó utilizando la ecuación (20).

Empleando los componentes adyacentes de la Mezcla 1 (**Figura 10**) que corresponden a sacarosa y glucosa, con los datos que se muestran en la **Tabla 5**, se obtiene una resolución de 5.01. Para que la separación de 2 picos contiguos sea considerada buena el valor de R_s debe ser mayor o igual a 1.5, esto garantiza que los componentes de la muestra están bien separados, de tal forma que el área o altura de cada pico puede ser medida con precisión (CHROMacademy, s.f. y Fornstedt et al., 2015). Dicho lo anterior, el valor R_s calculado garantiza una muy buena separación entre los picos adyacentes, lo que indica que se tiene buena resolución.

Tabla 5. Tiempo de retención y amplitud de componentes A y B.

(tR)A	WA	(tR)B	WB	R_s
12.191	0.4257	14.283	0.4098	5.01

(tR)B y WB, son los valores para el compuesto retenido con mayor fuerza. (tR)A y WA son los valores correspondientes al compuesto retenido en menor medida.

4.2.2 Parámetro de Linealidad, límite de detección y límite de cuantificación.

4.2.2.1 Linealidad

El parámetro de linealidad fue determinado mediante la confección de 8 curvas de calibración para cada azúcar. Cada curva contaba con 5 concentraciones en un intervalo de 0.15 a 1.5

mg/mL. En la **Tabla 6**, se observa el promedio de los coeficientes de correlación de las 8 curvas para cada carbohidrato. Según PAHO (2008), Quattrocchi et al. (1992), Gutiérrez (2012), Duffau et al. (2010) y Arriola (2012) el valor de R^2 debe ser ≥ 0.99 . Para este tipo de análisis de azúcares por HPLC-RI, Jalaludin y Kim (2021) reportan valores de $R^2 \geq 0.99$ para sacarosa, glucosa y fructosa. Ma et al. (2014) obtuvo $R^2 > 0.99$ para las 3 azúcares. Zielinski et al. (2014) reporta valores de $R^2 = 0.999$ para las 3 azúcares. Y Hadjikinova et al. (2017) reporta valores de coeficiente de correlación $R^2 > 0.99$ para sacarosa, glucosa y fructosa. Al contrastar con los valores de referencia de las guías de validación y de los trabajos citados, se puede indicar que los valores de los coeficientes de correlación R^2 mostrados en la **Tabla 6** presentan similitud con los valores obtenidos en otras validaciones y están dentro de lo recomendado por distintas fuentes.

4.2.2.1 Límite de detección

Magnusson & Örnemark (2014), establecen en la guía Eurachem que para la validación habitualmente se calcula un límite de detección empleando el enfoque de (3s) como se muestra en la ecuación (24). Este enfoque surge de la relación que existe entre la señal y el ruido, de esta forma la cantidad mínima detectable de un analito es 3, esto quiere decir, que la señal debe ser 3 veces mayor que el ruido, para que sea considerada como una señal detectable distinta del ruido (IUPAC, 1995). El valor de s en 3s proviene de la medición de la desviación de la señal del blanco que suele representarse como $S_{Y/X}$, y se obtiene la desviación estándar de la curva de calibración. (Duffau et al., 2010), este valor $3S_{Y/X}$ dividido entre la pendiente de la curva de calibración es el LD. Siendo, los LD obtenidos de 0.035, 0.019 y 0.033 para sacarosa, glucosa y fructosa respectivamente, como se muestra en la **Tabla 6**. Siendo estos valores similares con lo reportado en literatura. Hadjikinova et al. (2017), reporta valores de 0.06, 0.09 y 0.13 para sacarosa, glucosa y fructosa respectivamente en un rango analítico de 0.5-10 mg/mL. Ma et al. (2014) reporta valores de 0.00027, 0.00027 y 0.00007 para sacarosa, glucosa y fructosa en un rango de 0.02-0.04 a 1-2 mg/mL. Y Jalaludin y Kim (2021), presentan valores de 0.019, 0.021 y 0.111 para sacarosa, glucosa y fructosa en un rango analítico de 0.039-10 mg/mL.

4.2.2.3 Limite de cuantificación

El límite de cuantificación indica la cantidad mínima de analito que puede cuantificarse con seguridad estadística. Esta cantidad mínima cuantificable de un analito se asigna en base a la relación Señal/Ruido, esto quiere decir que para que una señal sea cuantificable debe ser 10 veces mayor al ruido (ver **Anexo 3**). El límite de cuantificación es entonces $10s$, al igual que para el límite de detección, s proviene de la medición de la desviación estándar de la curva de calibración que suele representarse como $S_{Y/X}$, este valor $10S_{Y/X}$ dividido entre la pendiente es el LC. Se calculó el LC utilizando la ecuación (27), los valores obtenidos 0.118, 0.064 y 0.110 corresponden a sacarosa, glucosa y fructosa respectivamente en un rango analítico de 0.15-1.5 mg/mL (Tabla 6). Ma et al. (2014), reporta valores de límite de cuantificación de 0.00091, 0.00091 y 0.00022 para sacarosa, glucosa y fructosa en orden respectivo para un rango analítico de 0.02-0.04 a 1-2 mg/mL. Jalaludin y Kim presentan valores de 0.058, 0.064 y 0.337 para sacarosa, glucosa y fructosa en orden respectivo en un rango analítico de 0.039-10 mg/mL. Y Hadjikinova et al. (2017), obtuvo valores de 0.22, 0.31 y 0.46 para sacarosa glucosa y fructosa respectivamente en un rango analítico de 0.5-10 mg/mL. Los valores tanto de LD como de LC son comparables a otros estudios que emplearon el mismo método, se observa que los límites de cuantificación suelen estar relativamente cerca del límite inferior del rango analítico, de hecho, el valor del límite de cuantificación representa el límite inferior del rango de trabajo (Magnusson & Örnemark, 2014). El LC determina que los valores estimados por encima de este valor son determinados con una fiabilidad aceptable, sin embargo, el hecho de que la señal de una muestra se encuentre por debajo del LC no quiere decir que el analito está ausente, para ello es determinado también el LD, si la señal registrada está entre LD y LC el analito puede ser reportado como detectado, con un nivel de confianza al 95 % (APA, 2022).

Tabla 6. Resumen de los parámetros (linealidad, LD, DC, intervalo de trabajo).

Compuesto	Coefficiente de Correlación (R^2)	LD (mg/mL)	LC (mg/mL)	Intervalo analítico (mg/mL)	Int. de trabajo (mg/mL)
Sacarosa	0.999	0.035	0.118	0.15-1.5	0.118-1.71
Glucosa	0.999	0.019	0.064	0.15-1.5	0.064-1.59
Fructosa	0.999	0.033	0.110	0.15-1.5	0.110-1.57

4.2.5 Exactitud

Según Arriola (2012) y Quattrocchi et al. (1992), para evaluar la exactitud añadiendo un estándar (valor conocido) se debe utilizar un mínimo de 3 concentraciones, 3 repeticiones por concentración. Para ello se realizaron enriquecimientos a 3 concentraciones diferentes (50 %, 100 %, 150 %) para cada uno de los carbohidratos (sacarosa, glucosa, fructosa) teniendo un total de 45 determinaciones. En la **Tabla 7** se muestran los porcentajes de recuperación de los 3 carbohidratos a diferentes concentraciones.

Para la sacarosa se observan recuperaciones 105.8 %, 100.3 % y 98.9 % a concentración baja, media y alta respectivamente, para glucosa 104 %, 99.8 % y 98.2 % y para fructosa 101.7 %, 103.2 %, 100.9 %. Según PAHO (2008) y Arriola (2012) el porcentaje de recuperación puede estar entre 90 % y 110 %, el Codex Alimentarius de la FAO/OMS (2018) indica que, para muestras de concentraciones aproximadas similares a las empleadas en el presente trabajo la recuperación estimada está entre 95 % y 105 %. Esto garantiza que los porcentajes de recuperación obtenidos, en el presente trabajo, para las tres azúcares están dentro de los intervalos establecido por las referencias. Contrastando con otros métodos HPLC-IR para determinar azúcares, tenemos que Hadjikinova et al. (2017) realizó enriquecidos a 2 niveles (Lv1) y (Lv2), obteniendo porcentajes de recuperación de 98 % y 106 % para sacarosa, 93 % y 102 % para glucosa y 96 % y 103 % para fructosa. Jalaludin y Kim (2021) tuvieron porcentajes de recuperación cercanos al 100 % para los 3 azúcares. Ma et al. (2014) obtuvo porcentajes de recuperación entre 96.05 % y 103.32 % para las 3 azúcares. Zielinski et al. (2014), obtuvo porcentajes de recuperación de 97.79 %, 97,16 % y 99.06 % para sacarosa, glucosa y fructosa respectivamente.

Tabla 7. Porcentaje de recuperación de las muestras enriquecidas.

Compuesto	Recuperado (%)		
	Concentración Baja 50%	Concentración media 100%	Concentración Alta 150%
Sacarosa	105.8	100.3	98.9
Glucosa	104	99.8	98.2
Fructosa	101.7	103.2	100.9

Se determina el porcentaje de error tomando como valor teórico 100.

Tabla 8. Valor absoluto de los porcentajes de error para los recuperados.

Compuesto	Concentración Baja	Concentración media	Concentración Alta
Sacarosa	5.8	0.3	1.1
Glucosa	4	0.2	1.8
Fructosa	1.7	3.2	0.9

También se evaluó la recuperación implementando una prueba t (Quattrocchi et al., 1992 y Duffau et al., 2010) mediante la siguiente ecuación:

$$t_{cal} = \frac{[100 - R\%]}{\sigma + \sqrt{n}} \quad (28)$$

El valor calculado se contrasta contra el valor t_{teo} para n, grados de libertad n-1, el porcentaje de seguridad $(1 - \alpha)$ para un error de 0.05, lo que es igual a una confianza de 95%, el valor teórico entonces es 2.776.

Según Duffau et al. (2010) si $t_{cal} > t_{teo}$ existe diferencia estadísticamente significativa y los resultados deberán ser corregidos, por otro lado, si $t_{cal} < t_{teo}$ no hay diferencia estadísticamente significativa y no es necesario realizar correcciones.

Los datos de la **Tabla 9**, muestran que los porcentajes de recuperación al ser evaluados mediante una prueba t arrojan valores menores al valor teórico, esto quiere decir que no existe diferencia estadísticamente significativa, por lo tanto, no es necesario realizar correcciones.

Tabla 9. Evaluación de la exactitud mediante uso de t student.

Evaluación de la exactitud						
Compuesto	Conc. Baja (t calculado)	Conc. Media (t calculado)	Conc. Alta (t calculado)	Conc. Baja	Conc. media	Conc. Alta
Sacarosa	1.12	0.96	0.26	No sig.	No sig.	No sig.
Glucosa	0.04	0.03	0.43	No sig.	No sig.	No sig.
Fructosa	0.93	1.11	0.53	No sig.	No sig.	No sig.

4.2.6 Precisión

La evaluación de la precisión se determinó mediante repetibilidad, las referencias mundiales indican que se deben realizar mínimo 5 o 6 repeticiones (para una concentración) o 3

repeticiones a 3 concentraciones distintas y evaluar su coeficiente de variación (CV) o desviación estándar relativa (RSD) (Quattrocchi et al., 1992; PAHO, 2008; Arriola, 2012 y Duffau et al., 2010). Para ello se evaluó la RSD de los enriquecimientos a 3 concentraciones diferentes (50 %, 100 %, 150 %) para cada uno de los carbohidratos (sacarosa, glucosa, fructosa) teniendo un total de 45 determinaciones. En la Tabla 10 se muestran los valores de RSD obtenidos, para sacarosa 2.2 %, 2.7 % y 0.5%, para glucosa 1.8 %, 2.9 %, 0.8 %, y para fructosa 2.9 %, 3.3 % y 0.7 %. PAHO (2008), dice que para repeticiones con un límite de valoración porcentual entre 90-110 %, la RSD (%) máxima es 3.9 %. El Codex Alimentarius de la FAO/OMS (2018) dice que para analitos de concentración similares a las del presente trabajo el RSD (%) debe estar en torno al 3%. En trabajos similares al presente, Hadjikinova et al. (2017) presenta valores RSD de 3.0 %, 4.4 %, 3.4 % para sacarosa, glucosa y fructosa respectivamente. Barreira et al. (2009) reporta valores de RSD de 3.23 %, 1.14 % y 3.64 % para sacarosa, glucosa y fructosa respectivamente. Jalaludin y Kim (2021) reportan valores de RSD menores a 3.5 % para las 3 azúcares. Ma et al. (2014), obtuvo valores de RSD entre 2.06% y 0.53 % para las 3 azúcares. Contrastando con las referencias mundiales y otros trabajos similares al actual, se puede aseverar que los RSD obtenidos en este trabajo están dentro de lo establecido como aceptable en las referencias.

Tabla 10. Desviación estándar relativa de la recuperación de las muestras enriquecidas.

Compuesto	RSD (%)		
	Concentración Baja	Concentración media	Concentración Alta
Sacarosa	2.2	2.7	0.5
Glucosa	1.8	2.9	0.8
Fructosa	2.9	3.3	0.7

4.3 Análisis de las muestras en HPLC

Una vez debidamente validado el método cromatográfico, empieza el análisis de las muestras. Esto se llevó a cabo siguiendo lo establecido en la guía validada para la determinación de carbohidratos por cromatografía líquida de alta resolución del Centro de Investigación en Bioquímica y Química Aplicada (CIBQUIA) desarrollada por este grupo de investigación (2022).

Se registraron las señales de los cromatogramas de las muestras y mediante extrapolación de las curvas de calibración correspondiente a cada azúcar (sacarosa, glucosa, fructosa) se determinó la concentración en mg/mL, el valor obtenido se multiplicó por el factor de dilución correspondiente a cada azúcar para obtener los mg/mL reales, este valor se multiplicó por el volumen total del jugo y se convirtió a gramos de cada azúcar, se sumó los gramos de cada azúcar para obtener los azúcares totales en g.

En la **Tabla 11**, se presentan los resultados obtenidos para el total de 75 muestras analizadas. Estos datos muestran que para el total de muestras analizadas el azúcar encontrado en mayor medida es la fructosa, seguida de la sacarosa y por último la glucosa. Las concentraciones máximas determinada en mg/mL son 101.7, 66.18 y 82.42 para sacarosa, glucosa y fructosa respectivamente. Las concentraciones mínimas determinadas en mg/mL son 0.52, 5.511 y 6.036 para sacarosa, glucosa y fructosa respectivamente. Para los azúcares totales calculados se obtuvo valores en un rango entre 5.6-46.6 g, y el rango teórico (etiqueta) 6.0-50 g. Los volúmenes totales en los envases de las muestras estuvieron entre 180 mL y 340 mL.

La OMS (2015) en sus directrices sobre la ingesta de azúcares para adultos y niños, recomienda reducir la ingesta diaria a un 5 %, esto representa para niños 15 g/día y para adultos 25 g/día. Para el total de muestras analizadas tenemos que el 96 % de las muestras contienen al menos la mitad de los 15 g/día recomendado para niños y 62.7 % tienen valores mayores o iguales a lo recomendado para un día. Para adultos, del total de muestras analizadas se obtiene que 76 % de las muestras contiene la mitad de los 25 g recomendados para un día y el 33.3 % tiene una cantidad de azúcar mayor o igual a lo recomendado (**Tabla 12**). Por las muchas implicaciones asociadas al consumo de azúcares, como se describió ampliamente en el marco teórico, resulta preocupante sobre todo en la población infantil que estos jugos de volúmenes relativamente pequeños tengan tan elevada cantidad de azúcares.

Tabla 11. Resumen del análisis de muestras de jugo por HPLC.

	Sacarosa	Glucosa	Fructosa
n	75	75	75
Concentración total (mg/mL)	2305.36	1963.15	2594.590
Concentración máxima (mg/mL)	101.76	66.18	82.42
Concentración mínima (mg/mL)	0.52	5.51	6.04
Media	33.41	26.18	34.60
Azúcares Totales (g)			
	Calculado		Etiqueta
	Máximo	Mínimo	Máximo
	Mínimo		Mínimo
	46.6	5.6	50.0
			6.0

*Para ver el desglose total de los datos revisar **Anexo 4**.

Tabla 12. Muestras con cantidad de azúcares (g) mayor o igual a lo recomendado.

	Cantidad de azúcar (g)			
	≥ 7.5	≥ 15	≥ 12.5	≥ 25
Muestras con cantidad de azúcares $\geq a$	96 %	62.7 %	76 %	33.3 %

*Recomendado. Niños=15 g/día. Adultos=25 g/día.

4.4 Determinación del contenido de azúcares por espectroscopía NIR

NIR ha sido ampliamente empleado para análisis de carbohidratos, principalmente sacarosa, fructosa y glucosa. Como se describió previamente en el marco teórico, esta espectroscopia de tipo vibracional se basa en la absorción de la radiación infrarroja por parte de las moléculas, en las cuales sus enlaces químicos al ser bombardeados por rayos NIR pueden absorber, transmitir o reflejar dichos rayos. En la **Figura 11** se muestra la estructura química de las moléculas de los carbohidratos, analizadas en este trabajo, con sus respectivos enlaces.

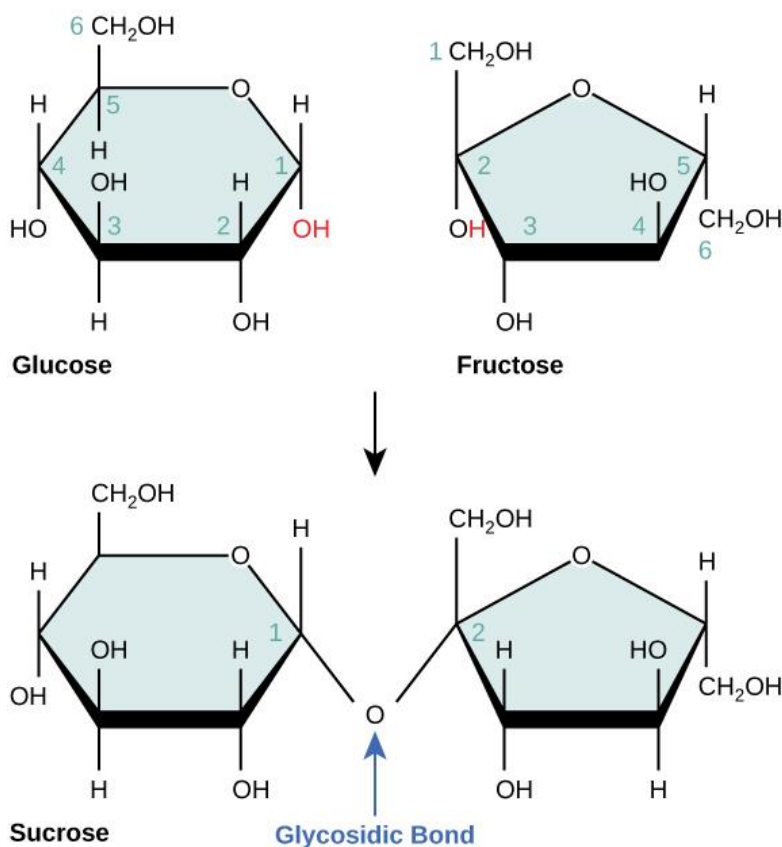


Figura 11. Estructuras químicas de glucosa, fructosa y sacarosa. Tomado de: OpenStax.

Las bandas correspondientes a los azúcares en la región NIR analizados en este trabajo pueden identificarse contrastando con los valores registrados en otros análisis. En la **Tabla 13** se muestran los valores en nanómetros y centímetros recíprocos recopilados por López et al. (2017). En el **Anexo 5** se muestran los principales grupos funcionales que se observan en la región NIR.

Tabla 13. Bandas características de los polisacáridos y oligosacáridos.

Tipo de carbohidrato	Banda de onda	Número de onda	
		nm	cm^{-1}
Glucosa	OH stretch 1st overtone	2340, 2255, 2150, 2085, 1902, 1730, 1590, 1520, 1385, 1195	4274, 4435, 4651, 4796, 5258, 5780, 6289, 6579, 7220, 8368
Glucosa	OH stretch/OH bend	1688	5924

Sacarosa	OH stretch 1st overtone	1433	6978
Sacarosa/glucosa/fructosa	OH combination	1928	5186
Sacarosa/glucosa/fructosa	OH stretch/CO stretch combination	2123–2200	4710–4717
Sacarosa cristalina	OH stretch 1st overtone	1443–1440	6930–6944
Polisacáridos	OH stretch/CO stretch combination	2274, 2271–2270	4398, 4403–4405
Polisacáridos	OH combination	2090	4785
Polisacáridos	OH stretch/OH bend	1920	5208
Polisacáridos	CH combination/CH 1st overtone	2328, 2270, 2078, 1920, 1587–1583	4295, 4405, 4813, 5208, 6300–6317
Polisacáridos	OH stretch 1st overtone	1437–1389	6960–7200

Adaptado de: López et al. (2017).

4.4.1 Análisis por Espectroscopía de Infrarrojo Cercano (NIR)

El registro de los espectros se hizo siguiendo la metodología del Centro de Investigación en Bioquímica y Química Aplicada (CIBQUIA) desarrollada por Monrroy (2021), como se muestra en la metodología.

Una vez registrados todos los espectros de las muestras **Figura 13**, los datos son transformados en modo absorbancia. Se procede a realizar el pre tratamiento matemático en aras de aumentar la relación señal ruido y de este modo incrementar la señal de los analitos de interés. Para ello los datos son pretratados mediante suavizados, derivadas y SNV. En la **Figura 14**, se muestra la primera derivada aplicada a los datos, esta derivación permite aumentar las diferencias entre las bandas anchas y solapadas del espectro. Al aplicar la primera derivada se eliminan los desplazamientos de línea base (Bernárdez, 2006).

En la **Tabla 14** se muestra un resumen estadístico de los azúcares evaluados por HPLC que serán usados para construir los modelos, se obtienen valores de media en mg/mL de 36.17, 26.16 y 33.88 para sacarosa, glucosa y fructosa. Valores mínimos de 0.52, 5.68 y 6.04 mg/mL para sacarosa glucosa y fructosa respectivamente. Y valores máximos de 101.76, 66.18 y 82.42 mg/mL para sacarosa, glucosa y fructosa respectivamente.

Tabla 14. Resumen estadístico de los azúcares determinados por HPLC.

Parámetro	Media	Mínimo	Máximo	SD	SD Mínimo	SD Máximo
Sacarosa (mg/mL)	36.17	0.52	101.76	0.97	0.01	4.76
Glucosa (mg/mL)	26.16	5.68	66.18	0.82	0.04	3.96
Fructosa (mg/mL)	33.88	6.04	82.42	1.03	0.03	4.75
Carb. Totales (mg/mL)	91.45	27.89	170.75	2.25	0.118	7.867

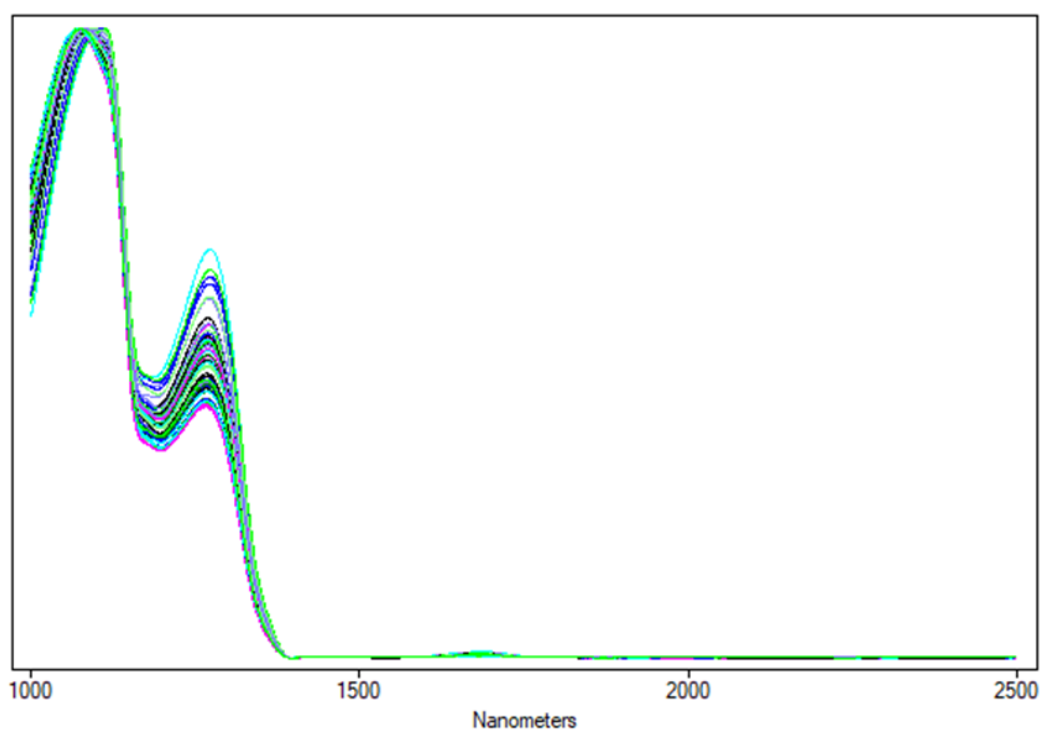


Figura 13. Espectros NIR de las muestras (jugos de fruta) en modo transmitancia.

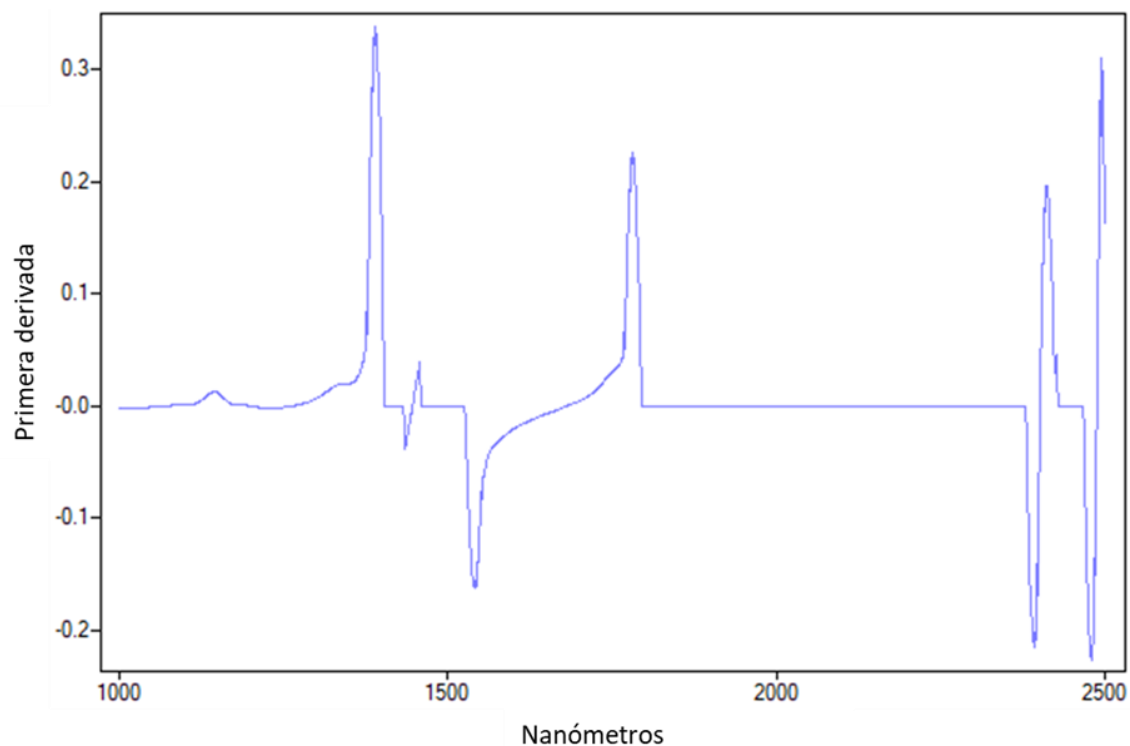


Figura 14. Espectros NIR de los jugos convertidos en absorbancia y transformados usando la primera derivada.

4.5 Calibración Multivariada

En la construcción de los modelos de calibración y validación se desarrollaron un aproximado de 50 modelos, variando los procesos matemáticos. De esta forma en este trabajo se presentan los datos de los mejores modelos obtenidos.

Los modelos se desarrollaron sobre la base del algoritmo de regresión por mínimos cuadrados parciales (PLSR). Esta regresión usa la información de concentración Y (datos obtenidos por HPLC) y la matriz de datos espectrales X, y calcula los factores de regresión, reduciendo el impacto de las variaciones X irrelevantes en el modelo de calibración. De esta forma se obtiene un conjunto de datos más rico en información de dimensionalidad reducida y elimina el ruido de datos lo que da como resultado modelos de calibración más precisos y reproducibles.

❖ Sacarosa.

Empleando el algoritmo PLSR para relacionar el contenido de sacarosa con los datos espectrales transformados a la primera derivada 1st der (35), con aplicación de SNV y OCR, se obtienen modelos de calibración, usando un rango en la región espectral de 1000 a 1324 y de 1643 a 1716 nm para la sacarosa, con R_c^2 de 0.97 y RMSEC de 4.2. Respecto de la validación cruzada o interna se muestra una correlación R_v^2 de 0.99 y RMSECV de 5. La proximidad entre los valores obtenidos en los errores de calibración y validación interna muestra la robustez de este modelo. En la **Figura 15** se muestran las curvas de calibración y validación cruzada.

Más tarde el modelo desarrollado para sacarosa se aplicó a un set externo de muestras para evaluar la capacidad predictiva del mismo. Como se muestra en la **Tabla 16**, se obtuvieron valores de R_p^2 de 0.97, RMSEP de 5.5 y SEP de 5.6, Bias de 1.9 y RPD de 5.2. La validación externa confirma la buena habilidad de predicción del modelo desarrollado para sacarosa, esto a razón de la similitud entre RMSECV=5 y RMSEP=5.5 y los R^2 de ambos, el bajo porcentaje de Bias (Jah y Gunasekaran, 2010) y el valor de RPD que por encima 3 se considera un modelo exitoso (Chen et al., 2021 y Monrroy et al., 2015). En la **Figura 19** se muestra la buena correlación que existe entre los datos estimados y los de referencia. El error obtenido es cercano a errores obtenidos por HPLC.

En trabajos similares, Liu et al. (2006) reporta para sacarosa (mg/mL), empleando la primera derivada, valores de RMSEC=2.25 y RMSEP de 3.35 y R_p^2 0.969. Xie et al (2009) en 120 muestras de jugo de “*Bayberry*” reporta valores (mg/mL) usando la primera derivada RMSEC=3.21, R_c^2 de 0.9067, RMSECV de 5.79, RMSEP 5.51. Rodríguez-Saona et al. (2001) reporta valores (mg/mL) en 60 muestras de jugos de manzana y naranja de SECV=1.71 y SEP=2.28. Simeone et al. (2017) reporta valores (mg/mL) en jugos de “Sweet Sorghum” (n=100) de RMSEC=3, R_c^2 de 0.99, RMSECV de 4.0, RMSEP de 4.0, R_p^2 de 0.98, Bias de 0.89 y RPD de 8.0. Los valores obtenidos en este trabajo son comparables con los de métodos similares.

❖ Glucosa

Para la glucosa empleando algoritmo PLS para relacionar el contenido de glucosa con los datos espectrales transformados a la primera derivada 1st der (35), con aplicación de SNV y

OCR, se obtienen modelos de calibración empleando, un rango en la región espectral de 1000 a 1324 y de 1643 a 1717 nm, con valores de R_c^2 de 0.98 y RMSEC de 2.3. Respecto de la validación cruzada o interna se muestra una correlación R_v^2 de 0.97 y RMSECV de 2.5. La proximidad entre los valores obtenidos en los errores de calibración y validación interna muestra la robustez de este modelo desarrollado para glucosa. En la **Figura 16** se muestran las curvas de calibración y validación cruzada.

El modelo desarrollado para glucosa se aplicó a un set externo de muestras para evaluar la capacidad predictiva del mismo. Como se muestra en la **Tabla 16**, se obtuvieron valores de R_p^2 de 0.90, RMSEP de 4.0 y SEP de 4.8, Bias de -1.3 y RPD=3.6. La validación externa muestra la habilidad de predicción del modelo desarrollado para glucosa, esto a razón de la cercanía entre RMSECV y RMSEP, los R^2 de ambos, el bajo porcentaje de Bias (Jah y Gunasekaran, 2010) y el valor de RPD que por encima 3 se considera un modelo exitoso (Chen et al., 2021 y Monrroy et al., 2015). En la **Figura 20** se muestra la buena correlación que existe entre los datos estimados y los de referencia. El error obtenido es cercano a errores obtenidos por HPLC.

En trabajos similares, Liu et al. (2006) reporta para glucosa (mg/mL), empleando segunda derivada, valores de RMSEC=1.81 y RMSEP de 1.87 y R_p^2 0.943. Días et al. (2011) reporta valores (mg/mL) en jugos de fruta (piña, mango, melocotón, tutti-frutti, naranja, y te fríos) de SEC=3.18, R_c^2 de 0.98 y SECV de 3.18 y R_v^2 de 0.96. Xie et al (2009) en 120 muestras de jugo de “*Bayberry*” reporta valores (mg/mL) usando la primera derivada RMSEC=0.896, R_c^2 de 0.7019, RMSECV de 1.19, RMSEP 0.96. Rodríguez-Saona et al. (2001) reporta valores (mg/mL) en 60 muestras de jugos de manzana y naranja de SECV= 1.57 y SEP=2.14. Simeone et al. (2017) reporta valores (mg/mL) en jugos de “Sweet Sorghum” (n=100) de RMSEC=0.8, R_c^2 de 0.97, RMSECV de 1.0, RMSEP de 1.0, R_p^2 de 0.94, Bias de -0.21 y RPD de 5.0. Los valores obtenidos en este trabajo son comparables con los de métodos similares.

❖ **Fructosa**

Para la Fructosa empleando el algoritmo PLS para relacionar el contenido de fructosa con los datos espectrales transformados a la primera derivada 1st der (35), con aplicación de SNV y OCR, se obtienen modelos de calibración empleando, un rango en la región espectral de 1000

a 1324 y de 1643 a 1718 nm, con valores de R_c^2 de 0.96 y RMSEC de 3.65. Respecto de la validación cruzada o interna se muestra una correlación R_v^2 de 0.94 y RMSECV de 4.3. La proximidad entre los valores obtenidos en los errores de calibración y validación interna muestra la robustez de este modelo desarrollado para fructosa. En la **Figura 17** se muestran las curvas de calibración y validación cruzada.

El modelo desarrollado para fructosa se aplicó a un set externo de muestras para evaluar la capacidad predictiva del mismo. Como se muestra en la **Tabla 16**, se obtuvieron valores de R_p^2 de 0.94, RMSEP de 4.9 y SEP de 5.0, Bias de 0.8 y RPD de 3.8. La validación externa muestra la buena habilidad de predicción del modelo desarrollado para fructosa, esto a razón de la similitud entre RMSECV=4.3 y RMSEP=4.9, el bajo porcentaje de Bias (Jah y Gunasekaran, 2010) y el valor de RPD que por encima 3 se considera un modelo exitoso (Chen et al., 2021 y Monrroy et al., 2015). En la **Figura 21** se muestra la buena correlación que existe entre los datos estimados y los de referencia. El error obtenido es cercano a errores obtenidos por HPLC.

En trabajos similares, Liu et al. (2006) reporta para fructosa (mg/mL), empleando segunda derivada, valores de RMSEC=1.66 y RMSEP de 3.22 y R_p^2 0.960. Días et al. (2011) reporta valores (mg/mL) en jugos de fruta (piña, mango, melocotón, tutti-frutti, naranja, y te fríos) de SEC=1.97, R_c^2 de 0.96 y SECV=4.31 y R_v^2 de 0.84. Xie et al (2009) en 120 muestras de jugo de “*Bayberry*” reporta valores (mg/mL) usando la primera derivada RMSEC=3.21, R_c^2 de 0.7019, RMSECV de 5.16, RMSEP 4.95. Rodríguez-Saona et al. (2001) reporta valores (mg/mL) en 60 muestras de jugos de manzana y naranja de SECV= 1.34 y SEP=1.78. Simeone et al. (2017) reporta valores (mg/mL) en jugos de “Sweet Sorghum” (n=100) de RMSEC=0.5, R_c^2 de 0.95, RMSECV de 0.6, RMSEP de 0.6, R_p^2 de 0.94, Bias de -0.01 y RPD de 5.0. Los valores obtenidos en este trabajo son comparables con los de métodos similares.

❖ Carbohidratos totales

Por último, se desarrolló un modelo para los carbohidratos totales empleando el algoritmo PLS para relacionar el contenido de fructosa con los datos espectrales transformados a la primera derivada 1st der (35), con aplicación de SNV y OCR, obteniendo modelos de

calibración, en la región espectral de 1000 a 1324 y 1643 a 1719 nm, con valores de R_c^2 de 0.99 y RMSEC de 4.1. Respecto de la validación cruzada o interna se muestra una correlación R_v^2 de 0.98 y RMSECV de 5.4. La proximidad entre los valores obtenidos en los errores de calibración y validación interna muestra la robustez de este modelo desarrollado para carbohidratos totales. En la **Figura 18** se muestran las curvas de calibración y validación cruzada.

El modelo desarrollado para carbohidratos totales se aplicó a un set externo de muestras para evaluar la capacidad predictiva del mismo. Como se muestra en la **Tabla 16**, se obtuvieron valores de R_p^2 de 0.98, RMSEP de 5.6 y SEP de 5.8, Bias de 1.2 y RPD de 6.7. La validación externa muestra la muy buena habilidad de predicción del modelo desarrollado para carbohidratos totales, esto a razón de la similitud entre RMSECV=5.4 y RMSEP=5.6 y los R^2 de ambos, el bajo porcentaje de Bias (Jah y Gunasekaran, 2010) y el valor de RPD que por encima 3 se considera un modelo exitoso (Chen et al., 2021 y Monrroy et al., 2015). En la **Figura 22** se muestra la buena correlación que existe entre los datos estimados y los de referencia.

Para carbohidratos totales en jugo de frutas (mg/mL), en su modelo de predicción Chen et al. (2021) utilizando en total 11 pretratamientos entre ellos 1era derivada, SGS, MSC, SNV reporta valores de calibración $R_c^2=0.99$, RMSEC=4.9 y predicción $R_p^2=0.98$, RMSEP=4.9 y RPD=6.51. Rodríguez et al. (2017) reporta valores en (mg/mL) para jugos de frutas artesanales de RMSEC=7.52, R_c^2 de 0.96, RMSECV de 13.5, R_v^2 0.85, RMSEP de 15.96, R_p^2 de 0.87 y RPD de 1.98. Los valores obtenidos en este trabajo son comparables con los de métodos similares.

En el presente trabajo se emplearon muestras de matrices distintas como se muestra en el **Anexo 4**, la heterogeneidad de las matrices representa un grado extra de complejidad siendo que algunas muestras presentan gran cantidad de pulpa y otras estaban altamente coloreadas, a pesar de ello los modelos desarrollados presentan buena capacidad de predicción, comparable a los modelos obtenidos de matrices más homogéneas. Los valores obtenidos en los modelos son parecidos a los obtenidos en otros trabajos similares. La habilidad de predicción se evalúa también comparando los valores de la validación interna y la externa, como lo hacen en las referencias citadas, los propios valores obtenidos por el modelo, se

emplean para dar fe de la funcionalidad del mismo, a partir de la similitud entre los valores de los errores, SEC, SEP y R de calibración y predicción de las muestras, los valores de sesgos bajos y RPD mayores a 3, lo que indica la estabilidad de los modelos.

Tabla 15. Resumen de los parámetros estadísticos del modelo desarrollado.

Propiedad	Sacarosa (mg/mL)	Glucosa (mg/mL)	Fructosa (mg/mL)	Carbohidratos totales (mg/mL)
Transformación de los datos	1st der (35), SNV, OCR	1st der (35), SNV, OCR	1st der (35), SNV, OCR	1st der (35), SNV, OCR
Intervalo de concentraciones	0.5-102	5.8-66.2	6-82	27-170
Región espectral	1000-1324,1643-1716	1000-1324,1643-1717	1000-1324,1643-1718	1000-1324,1643-1719
Factores PLS	6	4	4	8
Outliers	6	4	4	6
n	54	54	54	54
R_c^2	0.99	0.98	0.96	0.99
RMSEC	4.2	2.3	3.65	4.1
R_v^2	0.97	0.97	0.94	0.98
RMSECV	5	2.5	4.3	5.4

R_c^2 es el coeficiente de correlación de la calibración, **n** es número de muestras, R_v^2 es el coeficiente de correlación de la validación cruzada, **RMSEC** y **RMSECV** son el error cuadrático medio de calibración y validación cruzada respectivamente.

Tabla 16. Resumen de los parámetros estadísticos para la validación externa.

Propiedad	Rango	Validación externa					
		n	R_p^2	RMSEP	SEP	BIAS	RPD
Sacarosa (mg/mL)	7.8-83.7	8	0.97	5.5	5.6	1.9	5.2
Glucosa (mg/mL)	5.7-48.3	10	0.90	4.0	4.8	-1.3	3.6
Fructosa (mg/mL)	9.8-69	10	0.94	4.9	5.0	0.8	3.8
Carbohidratos totales (mg/mL)	27.9-135.8	8	0.98	5.6	5.8	1.2	6.7

R_p^2 = coeficiente de correlación de predicción.

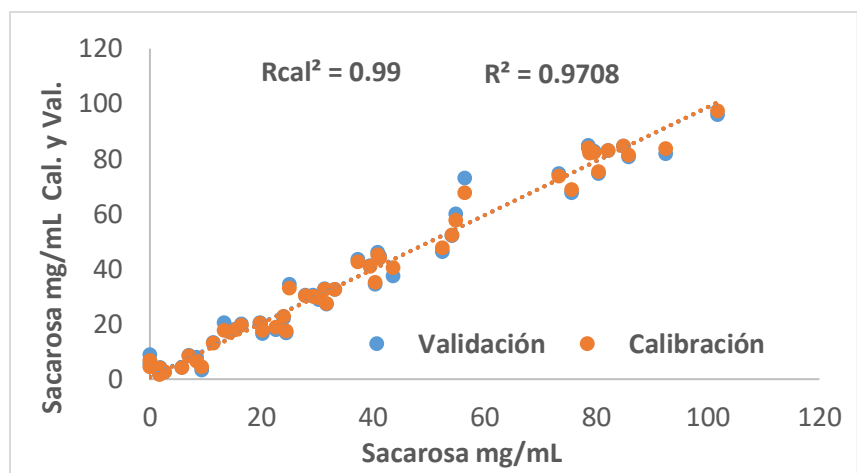


Figura 15. Curvas del modelo de calibración y validación cruzada para sacarosa.

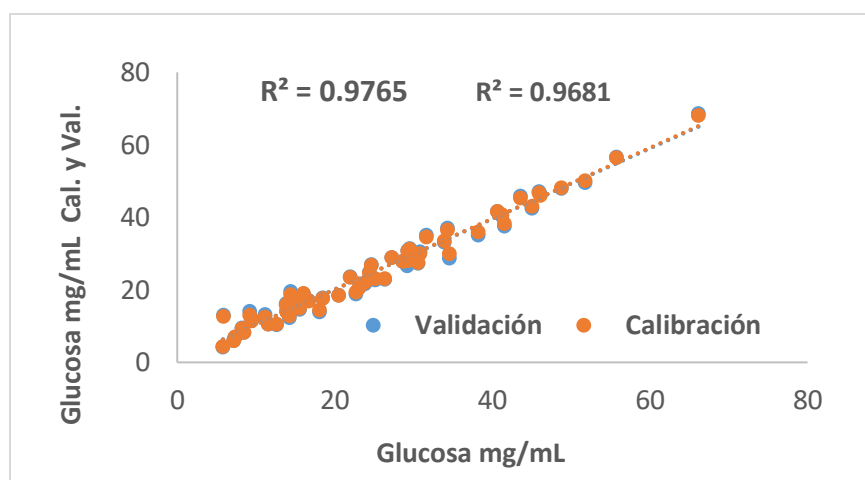


Figura 16. Curvas del modelo de calibración y validación cruzada para glucosa.

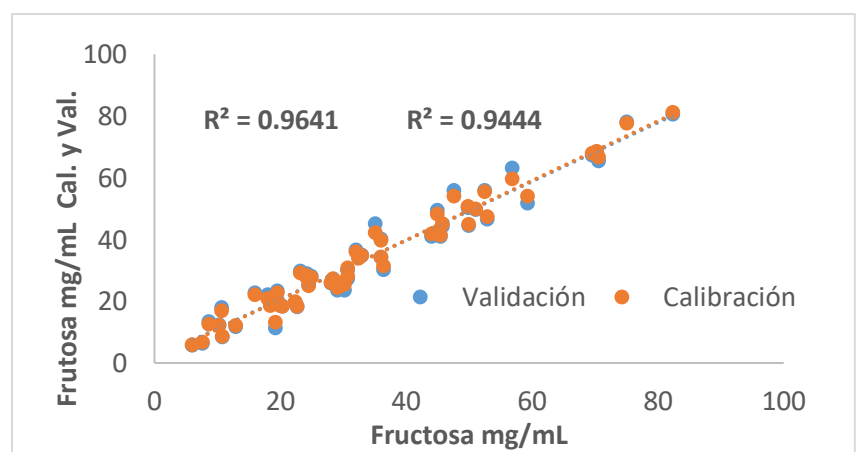


Figura 17. Curvas del modelo de calibración y validación cruzada para fructosa.

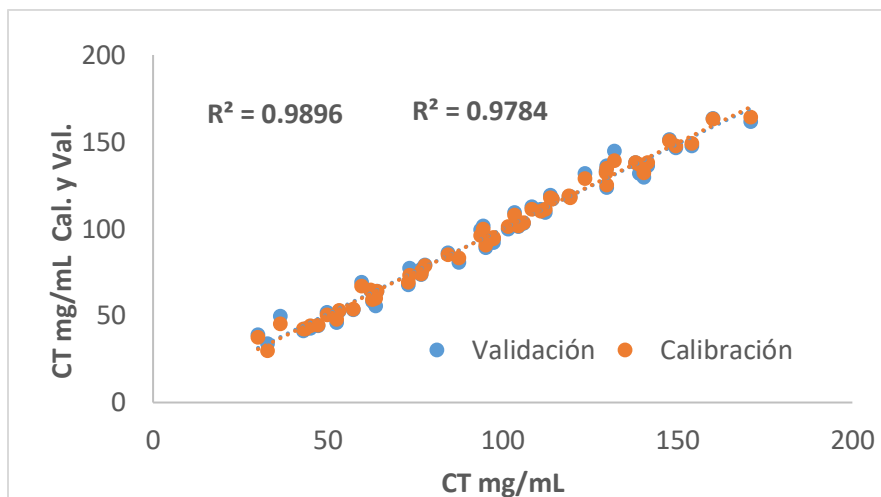


Figura 18. Curvas del modelo de calibración y validación cruzada para carbohidratos totales.

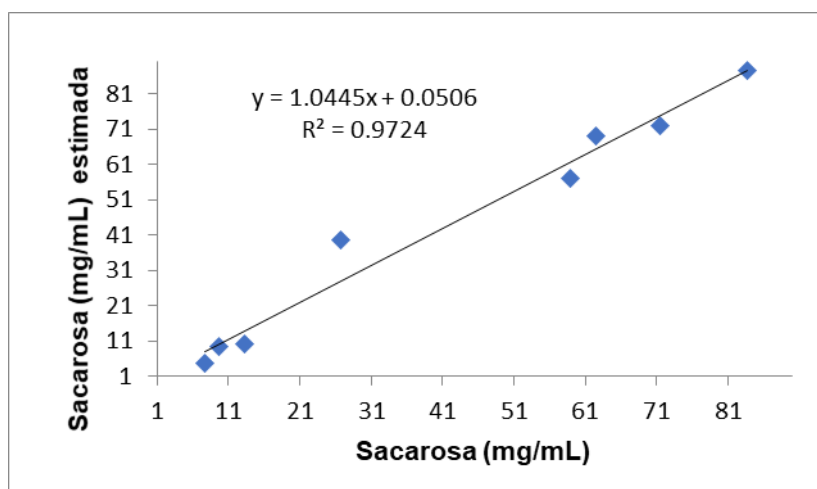


Figura 19. Correlación entre los datos de referencia y los de la validación externa para sacarosa.

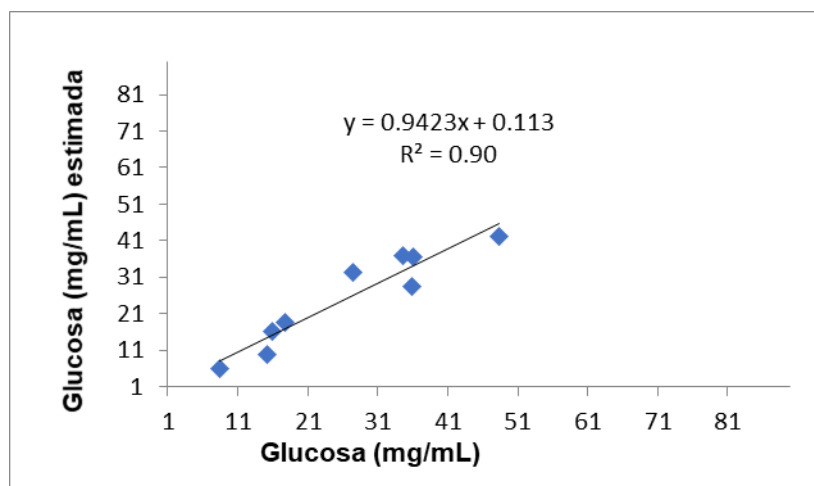


Figura 20. Correlación entre los datos de referencia y los de la validación externa para glucosa.

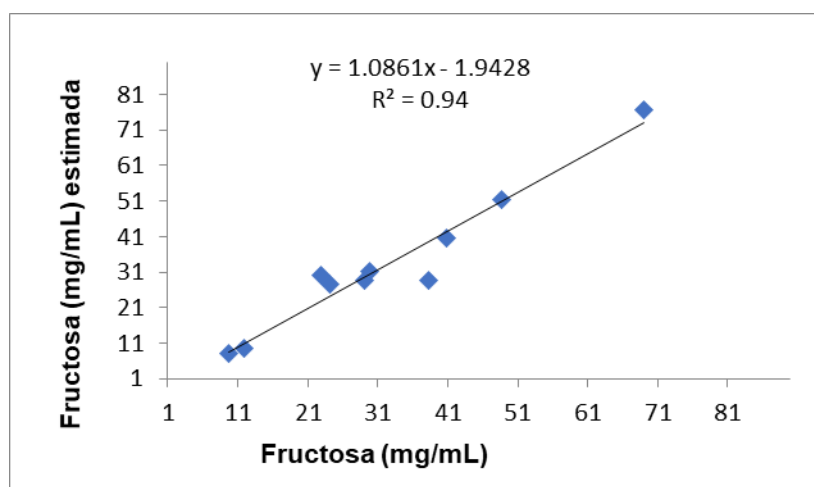


Figura 21. Correlación entre los datos de referencia y los de la validación externa para fructosa.

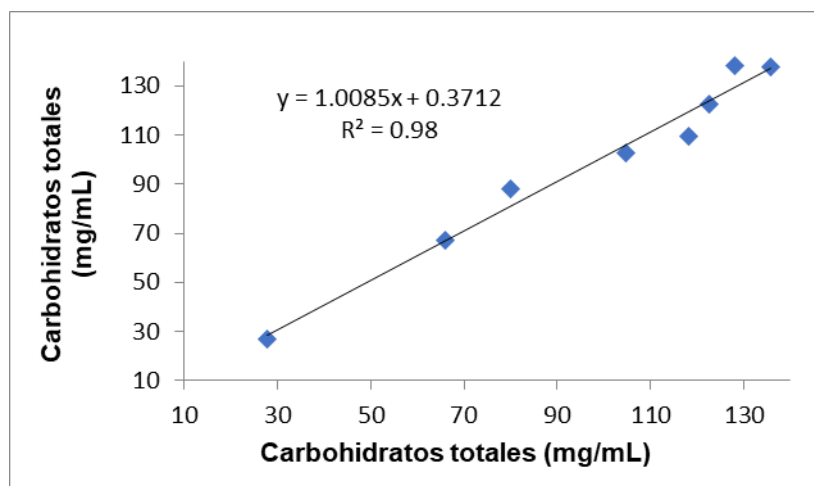


Figura 22. Correlación entre los datos de referencia y los de la validación externa para carbohidratos totales.

V. CONSIDERACIONES FINALES

5.1 Conclusiones

- Contar con herramientas que permitan realizar análisis y obtener datos de forma rápida representa una gran ventaja para el desarrollo científico y tecnológico para el país, es por ello que el desarrollo de métodos de monitoreo, determinación o cuantificación de diferentes componentes en los alimentos constituye un importante aporte.
- El método cromatográfico para determinación de azúcares fue validado y al contrastar los resultados obtenidos, con las referencias mundiales y otros trabajos similares, podemos indicar que la validación fue exitosa.
- Los errores obtenidos en los modelos PLSR-NIR en la determinación de sacarosa, glucosa, fructosa y carbohidratos totales, son comparables con los métodos con metodologías más parecidas a la desarrollada, por lo que se puede decir que son aceptables.
- La capacidad predictiva del modelo evaluado mediante validación externa, demuestra la aptitud de los modelos para determinar sacarosa, glucosa, fructosa y carbohidratos totales.
- El desarrollo de este trabajo permite demostrar que la cuantificación de sacarosa, glucosa y fructosa por HPLC y NIR se puede llevar a cabo con la misma seguridad en ambos métodos.

5.2 Recomendaciones

- ❖ El presente trabajo demuestra la buena capacidad de predicción de azúcares de los modelos desarrollados por NIR-PLSR empleando muestras variadas en cuanto a su matriz, es por ello que me tomo la libertad de recomendar ampliar el rango y cantidad de muestras ya sea siguiendo la línea de muestras heterogéneas o delimitando las muestras a un tipo más homogéneo de matriz, por ejemplo, jugos, bebidas o refrescos de un mismo tipo de fruta o productos de matrices similares.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- *CHROMacademy. (s.f.). Theory of HPLC. Detectors. Crawford Scientific.
- Action on Sugar. (2015). Sugar and Health. Disponible en: <http://www.actiononsugar.org/sugar-and-health/>
- Action on Sugar. (2016). Sugar and Health (SUGAR AND DIABETES 2). Disponible en: <http://www.actiononsugar.org/sugar-and-health/sugars-and-type-2-diabetes/>
- Action on Sugar. (2018). Sugar and Health (SUGAR AND OBESITY). Disponible en: <http://www.actiononsugar.org/sugar-and-health/sugar-and-obesity/>
- Agilent Technologies. (2016). Cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC): fundamentos y teoría.
- Agilent Technologies. (2020). Agilent Hi. Plex Ligand Exchange Columns. Data Sheet.
- Agilent Technologies. (2022). Ion Exclusion/Ligand Exchange Columns. Hi-Plex.
- Álvarez, D. (2021). Cromatografía. Concepto.de Argentina. Disponible en: <https://concepto.de/cromatografia/>
- apa (SALUD Y BIENESTAR LABORAL). (2022). Límite de detección y límite de cuantificación, ¿por qué es importante aprender a diferenciarlos? Disponible en: <https://apa.es/blog/higiene-industrial/limite-de-deteccion-y-limite-de-cuantificacion-por-que-es-importante-aprender-a-diferenciarlos/>
- Arriola, L. (2012). Validación de métodos analíticos, fisicoquímicos y microbiológicos.
- Asamblea Mundial de la Salud. (2015). 68.^a AMS de la Organización Mundial de la Salud. Ginebra, Suiza.
- Avenas, P. (2012). Etymology of Main Polysaccharide Names. P. Navard (ed.), The European Polysaccharide Network of Excellence (EPNOE).
- B. Magnusson; U. Örnemark (eds.). (2014). Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, (2nd ed.).
- Badui, S. (2006). Química de los alimentos. 4^a Ed. Pearson Educación.
- Bernárdez, M. (2006). Utilización de la Espectroscopía NIR en el control analítico de la industria farmacéutica. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona. Barcelona, España.
- Bolaños, J. (2016). El método NIR combinado con el análisis quimiométrico PLS-da para determinar la adulteración del aceite de oliva con aceite de girasol. Universidad de Costa Rica.

- Boulton, J; Hashem, K; Jenner, K; Lloyd-Williams, F; Bromley, H; Capewell, S. (2016). How much sugar is hidden in drinks marketed to children? A survey of fruit juices, juice drinks and smoothies. BMJ Publishing Group Limited.
- BRUKER. (2019). Conceptos básicos de la espectroscopía. Guía de espectroscopía infrarroja.
- Caja del Seguro Social (Panamá). (2019). LA OBESIDAD Y SUS EFECTOS. Disponible en: <http://www.css.gob.pa/web/29-abril-2019ob.html>
- Castillo, M. (2007). Aplicación de la Espectroscopia NIR al Control Analítico de Procesos de la Industria Química. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona.
- Chen, W; Li, H; Zhang, F; Xiao, W; Zhang, R; Chen, Z. (2021). Handheld short-wavelength NIR spectroscopy for rapid determination of sugars and carbohydrate in fresh juice with sampling error profile analysis.
- CHROMacademy. (s.f.). The theory of HPLC. Chromatographic Parameters. Crawford Scientific.
- CIMEC. (2019). Coeficiente de correlación Pearson. Disponible en: <https://www.cimec.es/coeficiente-correlacion-pearson/>
- Cozzolino D. (2016). Espectroscopía infrarroja cercana y autenticidad alimentaria. Improving Quality Throughout the Food Chain. Duxford, United Kingdom: Elsevier
- Cozzolino, D., Cynkar, WU, Shah, N. y Smith, P. (2011). Análisis de datos multivariados aplicado a la espectroscopia: aplicación potencial a la calidad del jugo y la fruta. Food Research International, 44(7), 1888–1896.
- CYTED. (2009). Aspectos prácticos de la validación e incertidumbre en medidas químicas. Área de desarrollo sostenible.
- Duffau, B; Rojas, F; Guerrero, I; Roa, L; Rodríguez, L; Soto, M; Aguilera, M; Sandoval, S. (2010). Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: “Aspectos prácticos sobre la validación de métodos”. Instituto de Salud Pública de Chile.
- FAO/OMS. (2018). Comisión Codex Alimentarius. Manual de procedimiento. Vigésima sexta edición.
- Federación Internacional de Diabetes (FID). (2022). Atlas de Diabetes 10^a edición.
- Federación Mundial de Obesidad. (2022). Atlas de Obesidad 2022.
- Ferré, J. (2006). Calibración multivariante en el análisis cuantitativo. El modelo inverso. Universidad Rovira i Virgili. Tarragona, España.
- Fornstedt, T; Forssén, P; Westwelund, D. (2015). Basic HPLC Theory and Definitions: Retention, Thermodynamics, Selectivity, Zone Spreading, Kinetics and Resolution.

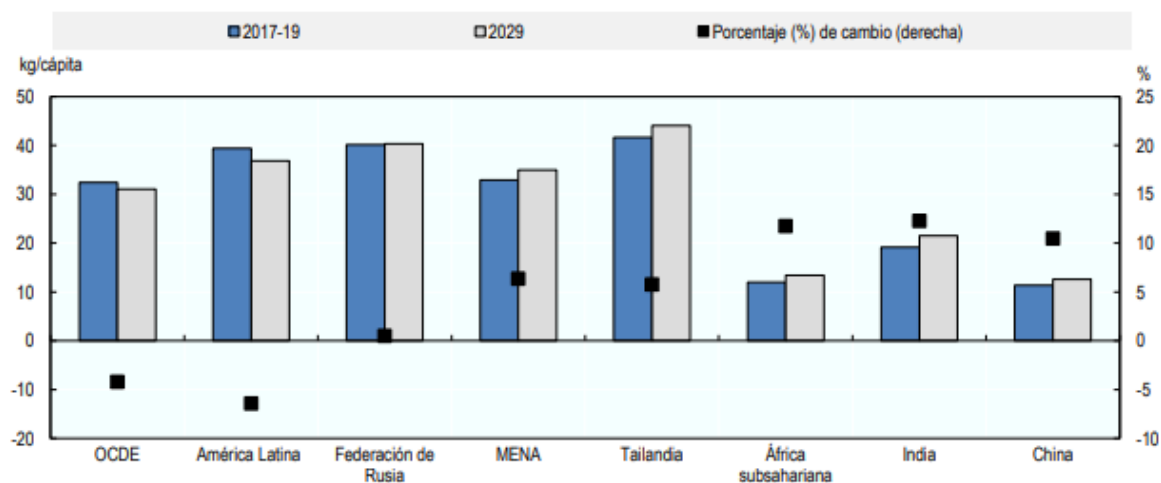
- Fraknoi, A; Morrison, D; Wolff, S. (2016). Astronomy, Chapter 5: Radiation and Spectra. OpenStax. Openstax. <https://openstax.org/books/astronomy/pages/preface>
- García, A; Yusá D. (2016). HPLC instrumental. UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA.
- García, L. (2020). Utilización de la espectroscopía NIR en el análisis de identificación y control de calidad de productos farmacéuticos liofilizados. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona. Barcelona, España.
- García-González DL, Baeten V, Fernández Pierna JA, Tena N. (2013). Infrared, Raman and Fluorescence Spectroscopies: Methodologies and Applications. En: Aparicio R y Harwood J, editors. Handbook of Olive Oil: Analysis and Properties. 2ªed. Nueva York: Springer.
- González, V. (2016). METODOS PLS EN ANALISIS MULTIBLOQUES: TRATAMIENTO DE DATOS FALTANTES Y MULTICOLINEALIDAD. Universidad Politécnica de Cataluña. Barcelona, España.
- Groenewald, T. (2007). Espectroscopía de Infrarrojo Cercano (NIR) - La técnica de análisis rápidos del futuro.
- Grupo de Quimiometría y Cualimetría de Tarragona. (2002). QUIMIOMETRÍA, una disciplina útil para el análisis químico. Universidad Rovira i Virgili. Tarragona, España.
- Gutiérrez, K. (2012). Desarrollo y validación prospectiva de una técnica analítica por cromatografía líquida de alta performance (HPLC) para cuantificar lidocaína base en una pomada. Arequipa, Perú.
- ICUMSA. (2022). Técnicas para el análisis de azúcares.
- IUPAC. (1974). Recommendations on Nomenclature for Chromatography. Pure Appl. Chem.
- IUPAC. (1995). Nomenclature in evaluation of analytical methods, including detection and quantification capabilities. Pure Appl. Chem.
- Jalaludin, I. y Kim, J. (2021). Comparación de detecciones ultravioleta y de índice de refracción en el análisis HPLC de azúcares. Química alimentaria, 365, 130514.
- Jha, SN y Gunasekaran, S. (2010). Autenticación de la dulzura del jugo de mango usando espectroscopía de reflexión total atenuada por infrarrojos transformada de Fourier. Revista de Ingeniería de Alimentos, 101(3), 337–342.
- Kowalski, B; Beebe, K. (1987). Una introducción al análisis y calibración multivariante. Laboratorios de Quimiometría. Universidad de Washigton.

- Lazo, R. (2018). Espectroscopía de absorción infrarroja (TF-IR) por Transformada de Fourier.
- Liu, Y; Ying, Y; Yu, H. y Fu, X. (2006). Comparación del método HPLC y el análisis FT-NIR para la cuantificación de glucosa, fructosa y sacarosa en manzanas intactas. *Revista de Química Agrícola y Alimentaria*, 54(8), 2810–2815.
- López, M; Franco-Robles, E; García-González, A. (2017). Carbohydrate Analysis by NIRS-Chemometrics. Center for Research and Advanced Studies of the National Polytechnic Institute, Irapuato, Mexico.
- Ma, C; Sun, Z; Chen, C; Zhang, L; & Zhu, S. (2014). Simultaneous separation and determination of fructose, sorbitol, glucose and sucrose in fruits by HPLC–ELSD. *Food Chemistry*, 145, 784–788.
- Mc Donald, A; Bradshaw, R; Fontes, F; Mendoza, E; Motta, J; Cumbreira, A. (2015). Prevalence of obesity in panama: some risk factors and associated diseases.
- Mondragón, P. (2020). Principios y aplicaciones de la espectroscopia de infrarrojo en el análisis de alimentos y bebidas. Primera edición.
- Monrroy, M. (2022). Determinación de carbohidratos por cromatografía líquida de alta resolución. Centro de Investigación en Bioquímica y Química Aplicada (CIBQUIA). Chiriquí, Panamá.
- Monrroy, M; García R. J; Troncoso, E; Freer, J. (2015). Fourier transformed near infrared (FT-NIR) spectroscopy for the estimation of parameters in pretreated lignocellulosic materials for bioethanol production.
- Monrroy, M; Gutiérrez, D; Miranda, M; Hernández, K; García R. J. (2017). Determination of *Brachiaria* spp. forage quality by near-infrared.
- Naes, T; Isaksson, T; Fearn, T; Davies T. (2004). A user-friendly guide to Multivariate calibration and Classification. NIR publications. Chichester, UK.
- OCDE-FAO. (2020). Perspectivas Agrícolas 2020-2029.
- OMS (2021). Diabetes. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/diabetes>
- OMS. (2015). Ingesta de azúcares para adultos y niños. Disponible en: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/154587/WHO_NMH_NHD_15.2_spa.pdf;jsessionid=111B9D18D2800AB33EFFABC7C0BF9BA0?sequence=2
- OMS. (2018). Obesidad y sobrepeso. Disponible en: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>

- OpenStax. (s.f.). Carbohydrates. Biology. Openstax CNX. Disponible en: https://cnx.org/contents/GFy_h8cu@9.85:c7OsVIEc@6/Carbohydrates
- Organización Panamericana de Salud (OPS). (2019). El impacto del precio en el consumo de bebidas azucaradas en Panamá.
- Osborne BG. (2006). Espectroscopia de Infrarrojo Cercano en análisis de alimentos. *Encycl Anal Chem*.
- PAHO. (2008). Validación de métodos analíticos. Disponible en: https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2008/13_Modulo_VALIDACIoN_de_Metodos_Fisicoqcos.pdf
- Quattrocchi, O; Andrizzi, S; Laba, R. (1992). Introducción a la HPLC. Capítulo 10. Análisis cuantitativo. Buenos Aires, Argentina.
- Ramírez, J; Román, A. (2017). Importancia de los carbohidratos en la industria alimentaria. *Pädi Boletín Científico De Ciencias Básicas E Ingenierías Del ICBI*, 4(8).
- Ramis, G; García, M. (2001). Quimiometría. Editorial Síntesis S.A., Madrid, España.
- Rodriguez, K; Siebet, K; Spricigo, P & Ferreira, M. (2017). Near infrared spectroscopy sugar quantification in intact orange. *Citrus Research & Technology*.
- Rodríguez-Sanoa, L; Fry, F; McLaughlin, M; Calvey, E. (2001). Rapid analysis of sugars in fruit juices by FT-NIR spectroscopy. 200 C St. SW, Washington, DC 20204, USA.
- Romero, M. (2001). Desarrollo de nuevas metodologías analíticas en el control de calidad de la industria farmacéutica. Universidad Autónoma de Barcelona. Balletarra, España.
- Rubinson K.A., Rubinson J.F. (2000). Análisis Instrumental, Ed. Pearson Educación.
- SACN del Reino Unido. (2015). Carbohidratos y Salud. Disponible en: https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/445503/SACN_Carbohydrates_and_Health.pdf
- Salomón, F. (2015). Tecnología NIR, usos y Aplicaciones. Disponible en: <https://www.engormix.com/balanceados/articulos/tecnologia-nir-sus-usos-t32534.htm>
- Salud Pública de Inglaterra. (2012). Programa Nacional de Epidemiología Dental de Inglaterra: encuesta de salud bucal de niños de cinco años. Informe sobre la prevalencia y la gravedad de la caries dental. Disponible en: <http://www.nwph.net/dentalhealth/Oral%20Health%205yr%20old%20children%202012%20final%20report%20gateway%20approved.pdf>
- Scanco. (2020). Beneficios de la espectroscopía NIR: Parte 2. Equipos de laboratorio. SCANCO. Disponible en: <https://scancotec.com/blog/beneficios-de-la-espectroscopia-nir-parte-2/>

- Sheiham A. (2001). Efectos dietéticos sobre las enfermedades dentales. Public Health Nutr.
- Simeone, L; Parella, R; Schaffert, R; Damasceno, C; Pasquini, L. (2017). Near infrared spectroscopy determination of sucrose, glucose and fructose in sweet sorghum juice. Microchemical Journal.
- Skoog, D; Holler, F; Crouch, S. (2008). Principios de análisis instrumental. 6ta edición. CENGAGE Learning.
- STATISTA. (2022). Statista Consumer Market Outlook - Segment Report, JUICES REPORT 2022. Disponible en: <https://www.statista.com/outlook/cmo/non-alcoholic-drinks/juices/panama>
- Torres, G; Nájera, F; Vida, Y. (2009). La Mecánica Cuántica. La Espectroscopía Infrarroja. OCW-Universidad de Málaga.
- UNIQUIM (Unidad de Informática del Instituto de Química). (2016). HPLC. Universidad Autónoma de México. Disponible en: <https://uniquim.iquimica.unam.mx/glossary/hplc/>
- Wold, H. (1966) Estimación de componentes principales y modelos relacionados por mínimos cuadrados iterativos. En: Krishnaiah, PR, Ed., Multivariate Analysis, Academic Press, Nueva York.
- Wold, S., Esbensen, K. y Geladi, P. (1987). Análisis de componentes principales. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems.
- Xie, L; Ye, X; Liu, D & Ying, Y. (2009). Quantification of glucose, fructose and sucrose in bayberry juice by NIR and PLS. Food Chemistry.
- Zielinski, A; Braga, C; Demiate, I; Beltrame, F; Nogueira, A; & Wosiacki, G. (2014). Development and optimization of a HPLC-RI method for the determination of major sugars in apple juice and evaluation of the effect of the ripening stage. Food Science and Technology, 34(1), 38–43.
- Zossi, S; Ruiz, R; Sorol, N; Sastre, M. (2010). Espectroscopía por infrarrojo cercano (NIRS). Su aplicación en análisis de jugos de caña de azúcar. Revista Industrial y Agrícola de Tucumán.

ANEXOS

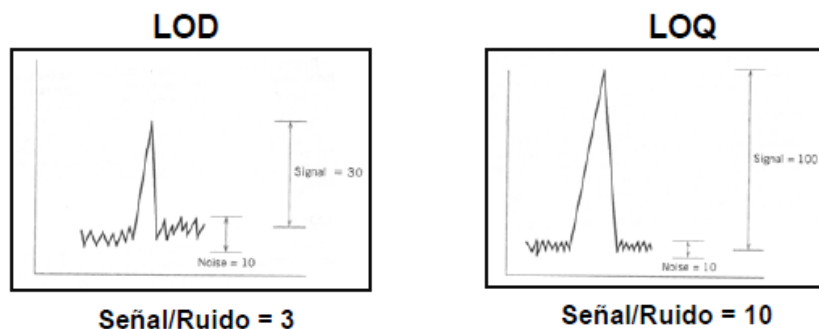


Anexo 1. Demanda de azúcar per cápita en los principales países y regiones. Fuente: OCDE/FAO (2020), “OCDE-FAO Perspectivas Agrícolas”.

Anexo 2. Sensibilidad y selectividad de algunos detectores HPLC.

Detector	Selectivity	Sensitivity Min Mass Detected
Refractive Index	Low	1 – 5 µg
Conductivity	Low	10 – 50 ng
UV/Visible	Medium	0.5 – 1.0 ng
Electrochemical	High	50 – 500 pg
Fluorescence	High	10 – 100 pg
Mass spectrometer	High	10 –100 fg

Anexo 3. Relación Señal/Ruido en Límite de Detección y Límite de Cuantificación.



LOD: Cantidad mínima detectable de un analito

LOQ: Cantidad mínima cuantificable de un analito

Anexo 4. Datos de las muestras analizadas por HPLC-RI.

CODIGO	Matriz	Volumen mL	Conc promedio (mg/mL)			Azúcares totales (g)	
			Sacarosa	Glucosa	Fructosa	Calculado	Etiqueta
1	Naranja	200	19.723	20.523	22.451	12.5	18
10	Mango-Naranja-Piña	200	39.484	9.414	10.687	11.9	14
11	Pera-Manzana	200	19.917	13.927	28.369	12.4	14
12	Naranja	200	15.186	15.422	18.026	9.7	9
13	Melocotón	200	9.779	8.358	9.755	5.6	6
14	Pera	200	0.871	5.884	23.255	6.0	7
15	Cítricos	250	13.398	29.205	30.275	18.2	17
16	Manzana	296	16.473	27.245	70.354	33.8	34
17	Manzana	200	13.248	35.920	68.963	23.6	23
18	Ciruela	207	0.546	46.314	36.151	17.2	33
19	Melocotón-Manzana	180	43.667	11.160	18.480	13.2	13
2	Melocotón	200	25.029	18.460	20.363	12.8	18
20	Manzana	330	78.656	23.832	36.488	45.9	50
21	Pera	330	82.117	17.727	29.807	42.8	48
22	Melocotón	330	80.439	24.659	24.277	43.6	48
23	Tamarindo	330	---	66.176	75.079	46.6	47
24	Guayaba-Piña	200	54.906	41.231	44.030	28.0	30

25	Manzana	200	31.655	33.868	45.291	22.2	16
26	Pera	200	56.491	18.012	19.240	18.7	16
27	Naranja	200	11.378	34.613	38.347	16.9	18
28	Melocotón	330	9.289	16.025	18.071	14.3	19
29	Uva	200	13.795	50.502	62.878	25.4	27
3	Manzana	200	24.505	13.867	24.929	12.7	15
30	Naranja	200	75.582	14.352	16.003	21.2	21
31	Ponche de frutas	295	---	51.765	45.471	28.7	29
32	Naranja-Piña	295	---	55.734	47.649	30.5	31
33.1	Manzana	200	1.114	15.539	32.981	9.9	9.4
33.2	Manzana	200	8.774	25.919	71.170	21.2	19
34	Pera	200	62.470	5.511	10.437	14.6	19
35	Melocotón	200	6.554	13.857	24.375	9.8	8.4
36	Mango	200	5.882	12.688	20.622	7.8	9.8
37	Piña	330	7.060	22.639	22.691	17.3	16.17
38	Melocotón	236	27.888	7.309	7.693	10.1	11
39	Pera	236	38.549	7.149	10.792	13.3	15
4	Pera	200	20.282	14.192	29.145	12.7	18
40	Manzana	200	84.983	29.278	45.751	32.0	31
41	Melocotón	200	40.923	45.902	44.955	26.4	31
42	Cítricos	250	33.170	5.793	6.036	11.2	12
43	Limón	330	101.757	8.444	8.690	39.2	43
44	Limón	330	1.769	48.735	51.043	33.5	32
45	Limón	250	24.069	34.307	36.065	23.6	24
46	Manzana	200	41.178	23.083	30.778	19.0	19
47	Mango	200	2.196	45.006	82.418	25.9	28
48	Manzana	200	40.416	40.663	56.853	27.6	20
49	Naranja	200	52.481	31.615	35.102	23.8	21
5	Manzana	180	29.333	16.638	30.697	13.8	12.6
50	Melocotón	200	54.210	43.526	49.843	29.5	30
51	Pera	200	51.533	30.535	49.964	26.4	33
52	Pera	200	85.803	8.194	19.537	17.2	28
53	Manzana	200	5.770	46.086	52.542	20.9	19
54	Cítricos	200	3.186	23.292	25.593	10.4	10
55	Guayaba-Piña	200	15.414	28.633	32.480	15.3	14
56	Uva	200	---	25.092	28.133	10.6	10
57	Guayaba-Piña	200	1.838	26.361	28.885	11.4	11
58	Manzana	207	14.321	24.355	69.639	22.4	20

59	Cóctel Vegetal	250	8.409	13.822	10.337	8.1	6
6	Pera	200	78.826	15.552	29.077	24.7	29
60	Ciruela	207	0.517	48.740	36.658	17.8	33
61	Ponche de frutas	236	31.314	21.983	24.274	18.3	12
62	Manzana	236	22.672	11.561	12.926	11.1	14
63	Manzana-Melocotón	200	26.693	15.230	24.080	13.2	14
64	Pera	200	37.322	41.502	70.580	29.9	20
65	Pera	200	73.291	38.184	59.282	34.2	31
66	Melocotón	200	58.931	35.993	40.879	27.2	19
67	Pera-Piña	200	2.700	9.170	24.550	7.3	8.6
68	Arándano	295	---	57.829	48.987	31.5	32
69	Sandía-cóctel de fruta	340	---	34.497	52.871	29.7	30
7	Mango	200	79.602	12.573	19.921	22.4	25
70	Ponche de frutas	200	92.472	29.523	32.063	30.8	32
71	Frambuesa	330	7.779	48.341	48.722	34.6	32
72	Ponche de frutas	200	1.244	44.701	71.433	23.5	27
73	Melocotón	200	20.875	11.443	8.753	10.0	12
74	Manzana	200	8.418	14.567	27.626	10.1	12
8	Ponche de frutas	200	83.670	15.954	22.858	24.5	26
9	Albaricoque	200	71.563	27.444	29.111	25.6	28

Anexo 5. Bandas analíticas principales y posiciones máximas relativas para absorciones prominentes del infrarrojo cercano. Tomado de: Scanco (2020).

